

**Über den Einfluß verschiedener Faktoren auf
den Glukosestoffwechsel von Schweineleukozy-
ten während der Phagozytose**

Barbara Hench

1977

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
Infektions- und Seuchenmedizin

des Fachbereichs Tiermedizin

der Universität München

(Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr)

Arbeit angefertigt unter Anleitung von
Prof. Dr. H. Buschmann

ÜBER DEN EINFLUSS VERSCHIEDENER FAKTOREN AUF
DEN GLUKOSESTOFFWECHSEL VON SCHWEINELEUKOZY-
TEN WÄHREND DER PHAGOZYTOSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des
Fachbereichs Tiermedizin
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Barbara Hench
aus
Gräfelfing/München

München 1976

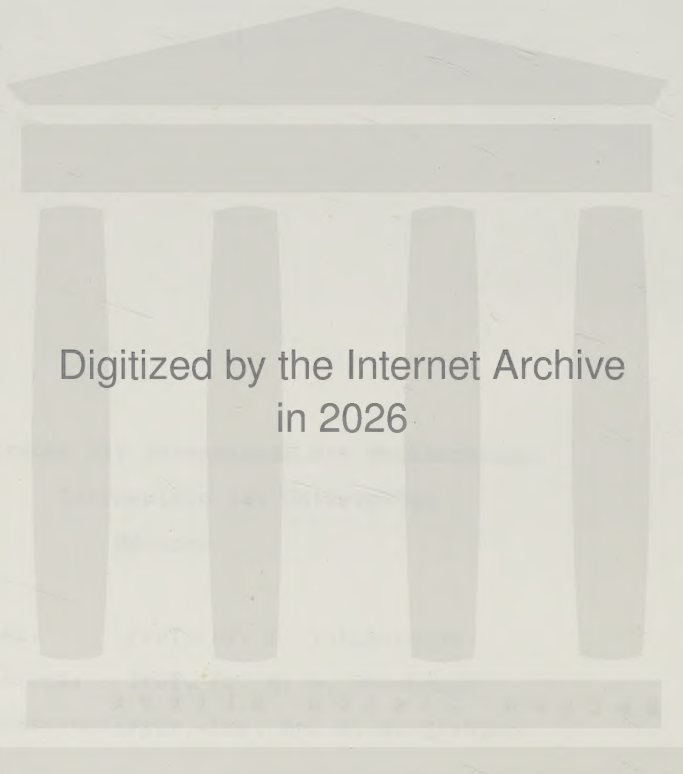
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. H. G. Buschmann
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. H. G. Liebich

Tag der Promotion: 25. Februar 1977



Meinen lieben Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung

II. Schrifttum

1. Die Phagozytose
2. Metabolische Veränderungen in den Phagozyten während der Phagozytose:
 - a) Atmung
 - b) Glykogenolyse und Glykolyse
 - c) Hexose-Monophosphat-Zyklus
 - d) Intrazelluläre Enzyme und antimikrobielle Substanzen
3. Die Phagozytose beeinflussende Faktoren:
 - a) Chemische Faktoren
 - b) Art der Partikel
 - c) Serumfaktoren
 - d) Genetische Faktoren
4. Metabolismus der Bakterien

III. Material und Methodik

1. Versuchstiere
2. Blutgewinnung und -behandlung
3. Verwendete Medien
4. Zur Phagozytose angebotene Partikel
5. Seren
6. Verwendete Zusätze
7. Methodik

IV. Ergebnisse

1. Messung des Glucose-1- ^{14}C Stoffwechsels
2. Der Einfluß der Art des Partikels auf die Phagozytoserate
3. Messung des Glucose-6- ^{14}C Stoffwechsels

4. Reproduzierbarkeit der bisher erhaltenen Ergebnisse
5. Einfluß der Anzahl der Partikel auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus
6. Einfluß der Inkubationszeit auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus während der Phagozytose
7. Einfluß verschiedener Serumzusätze auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus während der Phagozytose
8. Einfluß von aktivem bzw. inaktiviertem Serum auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus während der Phagozytose
9. Einfluß einer Erhöhung des Serumanteils auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus während der Phagozytose von lebenden Bakterien.
10. Untersuchung des Phagozytoseverhaltens während der ersten drei Lebensmonate
11. Der Einfluß von Medikamenten auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus während der Phagozytose
 - a) Klebsiella-Lipopolysaccharid
 - b) Hydrocortisonacetat
 - c) Dextran
12. Effekt einer Filtrierung des Blutes durch eine Nylonfaser Säule
13. Aufnahme von radioaktiv markierten Bakterien durch Schweineleukozyten

V. Besprechung der Ergebnisse

VI. Zusammenfassung

VII. Literaturverzeichnis

VIII. Lebenslauf

I. EINLEITUNG

Während der Phagozytose zeigen polymorphkernige Leukozyten eine Reihe von metabolischen Veränderungen, wie Ansteigen der Laktatproduktion, des O_2 Verbrauchs, der H_2O_2 Produktion und der Oxidation von Glucose über den Hexose-Monophosphat-Zyklus. In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Messung des Atmungsanstiegs und der Glucose-Oxidation als indirektes Maß für die Phagozytoseaktivität in den Leukozyten angesehen werden kann. Die meisten Untersuchungen wurden mit inerten Partikeln oder mit abgetöteten Bakterien durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Vergleich zwischen lebenden und abgetöteten Bakterien hinsichtlich ihrer Phagozytierbarkeit anzustellen und zu untersuchen, inwieweit die metabolische Reaktion der Leukozyten während der Phagozytose eine Funktion der Art des verdauten Partikels ist. Weiter wurde eine Reihe von Faktoren, die die Phagozytose beeinflussen können, hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf den Glucosestoffwechsel während der Phagozytose untersucht.

II. SCHRIFTTUM

1. Die Phagozytose

1910 wurde von SAWTSCHENKO die Behauptung aufgestellt, daß es zwei Phasen während der Phagozytose gibt:

1. Bindung der Bakterien an die Leukozyten infolge Veränderung der Oberflächenspannung durch die fixierende Substanz (Opsonin oder Ambozeptor-Komplement Komplex);
2. amöboide Bewegung der Phagozyten.

Keine der beiden Phasen der Phagozytose könne beim Fehlen von Elektrolyten vorkommen. PONDER (1926) hat den möglichen Einfluß der elektrischen Ladung von Zellen und Partikeln damit zu beweisen versucht, daß z. B. Leukozyten Quarzteilchen in sauren Lösungen schneller aufnehmen als Kohlepartikel, wohingegen die Kohle besser in schwach alkalischen Lösungen aufgenommen wird. MALTANER und HOPPE (1920) äußerten die Hypothese, Chemotaxis beruhe allein auf osmotischen Kräften; sie fanden, daß Leukozyten nur dann in Kapillarröhrchen mit verschiedenen Substanzen wandern, wenn diese ein höheres spezifisches Gewicht besitzen als die Leukozytenaufschwemmung. Da die Leukozyten sich dabei in gleicher Richtung wie die Wasserströmung und den diffundierenden Substanzen entgegen bewegen, schlossen sie, daß ihre Bewegung auf osmotischen Kräften beruht. ABRAMSON (1927) glaubte, ein Faktor in der Bestimmung der Leukozytenwanderung könne bei den in den Geweben vorhandenen elektromotorischen Kräften liegen, wobei die Leukozyten negativ geladen seien und dementsprechend zu den relativ positiven, geschädigten Geweben wanderten. GRAFT und JOCHIMS (1927) fanden, daß positive Chemotaxis wenigstens zum Teil auf H-Ionenwirkung beruht. H. G. WELLS (1932) erklärt die Phagozytose allein mit einer Veränderung der Oberflächenspannung. An dem Ort einer Zellschädigung oder Infektion werden Substanzen gebildet, welche eine positive Chemotaxis zeigen; die Leukozyten, welche im Lumen der Kapillaren wandern, werden von den chemotakti-

schen Substanzen am meisten auf jener Seite, von der die Substanzen diffundieren, getroffen. Die Oberflächenspannung wird auf dieser Seite herabgesetzt, was die Bildung von Pseudopodien und eine Bewegung in diese Richtung zur Folge hat. Nach Passieren der Gefäßwand setzt sich die Bewegung in derselben Weise und nach jener Seite fort, von welcher der chemotaktische Stoff kommt. Trifft der Leukozyt eine Substanz, die seine Oberflächenspannung genügend herabsetzt, so kommt es zur Phagozytose. Nach heutigen Erkenntnissen läßt sich der Phagozytosevorgang in folgende Schritte einteilen:

- a) Vorgang des Erkennens, wobei humorale und zelluläre Aspekte eine Rolle spielen.
- b) Vorgang der Ingestion: das Partikel wird mit Hilfe von Pseudopodienbildung vom Phagozyt einverleibt und in ein Phagosom eingeschlossen. Das Phagosom bewegt sich dann zentripetal vom hyalinen Ektoplasma weg. Bei Monozyten und Makrophagen verschmelzen nun die primären und sekundären Granula mit den Phagosomen, während bei Neutrophilen die primären und sekundären Granula zu verschiedenen Zeitpunkten der Ingestion abgebaut werden.
- c) Abtöten und Verdauen der Fremdpartikel. Hierzu stehen dem Phagozyt verschiedene antimikrobielle Mechanismen, wie saurer pH-Wert im Phagosom, die Bildung von Wasserstoffperoxid, hydrolytischen Enzymen, Laktoferrin, Lysozym, und kationische Proteine mit antibakterieller Aktivität zur Verfügung.

Die Inkorporation und Ingestion von Partikeln ist ein energieabhängiger Vorgang; er setzt ATP-bildende Prozesse in Gang, besonders die Glykolyse und Glykogenolyse in Neutrophilen, und die oxydative Phosphorylierung bei den Lungemakrophagen. Die metabolischen Vorgänge während der Phagozytose sind bisher Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen.

2. Metabolische Veränderungen in den Phagozyten während der Phagozytose

a) Atmung

BECKER, MUNDER und FISCHER (1958) fanden, daß die Zugabe von Bakterien (20/Leukozyt) den O_2 -Verbrauch der Phagozyten um 50 bis 200 % steigerte (Geringes Bakterienangebot hatte nur einen geringen O_2 -Mehrverbrauch zur Folge). Zugleich war die Milchsäurebildung um durchschnittlich 35 % erhöht. Die Stoffwechselsteigerung blieb während der mehrstündigen Versuchsdauer bestehen. Kein Unterschied im O_2 -Verbrauch konnte zwischen lebenden und toten Bakterien festgestellt werden. SBARRA und KARNOVSKY (1959) untersuchten den Einfluß der Partikelkonzentration auf die Atmung. Sie stellten fest, daß die Atmung von der Partikelzahl abhängig ist und daß die Atmung bei phagozytierenden polymorphkernigen Leukozyten mehr als doppelt so hoch war, als bei ruhenden polymorphkernigen Leukozyten. Weiter fanden sie, daß der Sauerstoffverbrauch mit der Konzentration des zugefügten Serums korreliert. Eine maximale Stimulierung war bei 33 % Serumzusatz erreicht. Bei Schweineleukozyten beobachteten IYER, ISLAM und QUASTEL (1961), daß die Glucose-Oxidation auch anaerob bei Anwesenheit von Eisencyanid oder Pyruvat stimuliert wurde; dies zeigt an, daß zugefügtes Pyruvat O_2 als Oxidationsmittel ersetzen kann.

SELVARAJ und SBARRA (1966), studierten die Stoffwechseländerungen, die in polymorphkernigen Meerschweinchen-Leukozyten während der Verdauung von inerten Partikeln auftreten. Sie stellten fest, daß Glykolyse-Inhibitoren die Phagozytose verhindern, während Atmungs-Inhibitoren keinen Einfluß darauf haben. Sie folgerten daraus, daß die aktive Glykolyse wesentlich für die Phagozytose ist. STRAUSS konnte 1962 feststellen, daß die Partikelgröße einen Einfluß auf den Atmungsanstieg hatte. Bei verwendeten Polystyren-Latex Partikeln, die kleiner als $0,2\mu$

im Durchmesser waren, konnte er keinen Anstieg der Atmung mehr feststellen.

BÖHNER, GILMAN und KARNOVSKY (1970) fanden, daß der Sauerstoffverbrauch bei menschlichen Leukozyten 2 mal höher ist, als bei Schweineleukozyten, sowohl während, als auch am Ende der Phagozytose.

DAVIDSON und TANAKA (1973) konnten mit Hilfe der Ionisationskammer-Methode zeigen, daß in der durch die Phagozytose stimulierten Zelle die Sauerstoff-Konzentration einen wesentlichen Einfluß hat. Die Glucose-Oxidationsrate betrug in 10 % Sauerstoff 65 %, in 20 % Sauerstoff jedoch 95 %. Kein Einfluß war bei der unstimulierten Zelle festzustellen; nur bei totaler Abwesenheit von O_2 sank die Glucose-Oxidationsrate.

b) Glykogenolyse und Glykolyse

EVENS (1961) stellte fest, daß polymorphkernige Leukozyten im Gegensatz zu den mononukleären Zellen einen Glykogengehalt von über 18 % des Trockengewichtes enthalten. STÄHELEIN und KARNOVSKY (1956) führten diesen Unterschied darauf zurück, daß mononukleäre Zellen im Gegensatz zu polymorphkernigen Leukozyten keine Milchsäure in Abwesenheit von exogener Glucose produzieren. Sie fanden bei den beiden Zellarten einen unterschiedlichen Atmungs- und Glykolysemetabolismus.

BECKER, MUNDER und FISCHER (1958) stellten fest, daß bei der Phagozytose der Leukozyten bereits 30 Minuten nach Einwirken der Bakterien die Glykogenabnahme im Mittel um 35 % steigt. Bei einem in-vitro Test mit Kaninchenleukozyten sahen COHEN und MORSE (1968), daß bei der Phagozytose eine anfängliche Periode der Glykolyse von einer anschließenden Periode der Glykogensynthese gefolgt war. Dabei war die Anwesenheit von exogener Glucose notwendig. Nach RAPOPORT (1964) tritt bei der Phagozytose der oxidative Pentoseweg, der auch im Ruhestoffwechsel überwiegt,

noch stärker hervor. Dieser steigt auf das 15-fache, während der Umsatz über den Emden-Meyerhof-Weg sich verdreifacht. Die Phagozytose ist jedoch nicht atmungsabhängig und tritt, gespeist durch die Glykolyse, auch anaerob auf. Dementsprechend ist auch eine Erhöhung des Glykogenabbaus festzustellen.

SBARRA und KARNOVSKY (1960) untersuchten die metabolischen Veränderungen bei Schweineleukozyten während der Phagozytose. Sie benutzten Polystyren-Partikel und konnten die Phagozytose sowohl unter aeroben wie anaeroben Bedingungen nachweisen. Während unter aeroben Bedingungen gesteigerte Laktatproduktion, gesteigerter O_2 -Verbrauch, und erhöhter Hexose-Monophosphat-Zyklus (HMS) zu beobachten war, war unter anaeroben Bedingungen der erhöhte Glykogen- und Glucoseverbrauch auffällig. Glykolysehemmer wie Jodacetat oder Fluorid verhinderten die Phagozytose, während Atmungshemmer, wie Antimycin A, Cyanid und Dinitrophenol keinen Einfluß auf die Phagozytose hatten. Sie folgerten daraus, daß für die Partikelaufnahme die Glykolyse notwendig ist, während der oxidative Stoffwechsel wahrscheinlich durch die aufgenommenen Partikel ausgelöst wird und für die Verdauung und Zerstörung der Partikel verantwortlich ist.

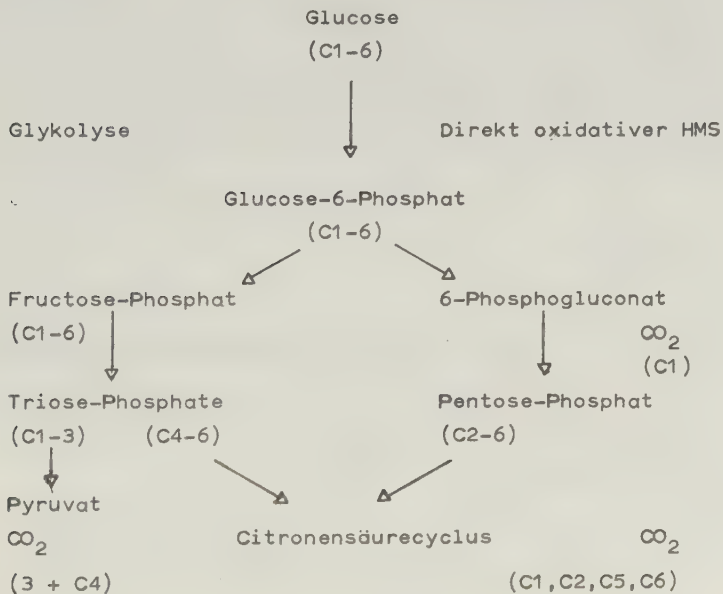
FISCHER und GINSBERG (1956) stellten fest, daß eine wirksame und fortgesetzte Phagozytose von Bakterien durch polymorphkernige Leukozyten sehr von der Verwendbarkeit der sie umgebenden Glucose abhing.

VON OSS (1971) wies nach, daß ein hoher Glucosespiegel (200, 400, 800 mg Glucose/100 ml) bei menschlichen Neutrophilen die Phagozytose von *Sta. epidermidis*, *Sta. aureus* und *Escherichia coli* signifikant unterdrückte; bei niedrigen Konzentrationen war ebenfalls ein Abfall der Phagozytoseaktivität zu bemerken. Die größte Aktivität zeigte sich bei einer Glucose-Konzentration von 50 und 100 mg/100 ml. Ein zweiter Effekt bei hoher Glucose-Konzentration war ein nachlassendes Adhäsionsvermögen der Neutrophilen an festen Oberflächen. Dies mag die verminderte Resistenz beim Diabetiker erklären.

DE CHATELET u.a. (1972) untersuchten den Einfluß von Aminosäuren auf die Stimulierung der HMS-Aktivität von Granulozyten. Sie fanden, daß das Hinzufügen von D- oder L-Aminosäuren (Alanin und Threonin) weder bei ruhenden noch bei phagozytierenden Neutrophilen ein Ansteigen des HMS bewirkt. Sie zogen daraus den Schluß, daß Aminosäure-Oxidase nicht die Quelle für die H_2O_2 -Erzeugung während der Phagozytose ist.

c) Hexose-Monophosphat-Zyklus (HMS)

Endogene Glucose kann glykolytisch oder direkt oxidativ nach folgendem Schema abgebaut werden:



1956 untersuchten STÄHELIN und KARNOVSKY den Glucoseabbau bei Leukozyten, die entweder von gesunden oder infizierten Tieren gewonnen worden waren. Sie benutzten dabei Glucose-1- ^{14}C und Glucose-6- ^{14}C . Sie stellten keinen unterschiedlichen Glucoseverbrauch bei kranken bzw. gesunden Tieren fest, konnten aber schon damals sagen, daß den Hauptenergielieferant für die Phagozytose der HMS darstellt.

1959 zeigten SBARRA und KARNOVSKY, daß bei phagozytierenden polymorphkernigen Leukozyten die CO_2 -Bildung aus Glucose-1- ^{14}C 7 mal größer, die CO_2 -Bildung aus Glucose-6- ^{14}C 2,5 mal größer als in Ruhe ist. Sie verglichen die Partikelaufnahme unter anaeroben und aeroben Bedingungen und konnten bei ersterem folgende metabolische Veränderungen feststellen:

- a) ansteigende Laktatproduktion,
 - b) ansteigender Sauerstoffverbrauch,
 - c) Anstieg von CO_2 aus C-1 und C-6 markierter Glucose;
- das Verhältnis C-1 : C-6 stieg von 8 : 1 bei ruhenden Zellen, auf 21 : 6 bei phagozytierenden Zellen. Unter anaeroben Bedingungen stieg während der Phagozytose der Glykogen- und Glucose-Verbrauch und die Laktatproduktion signifikant an. Sie zogen daraus den Schluß, daß aktive Glykolyse wesentlich für die Phagozytose ist und wahrscheinlich die benötigte Energie sofort bereitstellt.

COHEN und MORSE (1960) konnten auch bei polymorphkernigen Leukozyten, die bereits phagozytiert hatten, einen Anstieg im Glucose-Verbrauch feststellen.

Noch 1958 hatte BECK als wahrscheinlich angenommen, daß nur ein Bruchteil der gesamten Leukozytenglucose über den Hexose-Monophosphat-Zyklus metabolisiert wird.

d) Intrazelluläre Enzyme und antimikrobielle Substanzen

FISHMAN und SILVERMAN (1957) untersuchten Ratten-Leukozytenextrakte und fanden, daß sie bakterizide Eigenschaften gegen viele Bakterienarten zeigen. Die verantwortliche bakterizide Substanz war in den Mitochondrien der Leukozyten lokalisiert. Sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien wurden von dem Extrakt getötet. Grampositive Bakterien waren jedoch empfänglicher gegenüber der bakteriziden Aktivität des Mitochondrienextraktes als gramnegative Bakterien. Sie folgerten daraus, daß die digestive Phase der Phagozytose in Leukozyten in zwei Stufen abläuft: Ein nicht-enzymatisches Abtöten der aufgenommenen Organismen, gefolgt von der Verdauung als Folge der Einwirkung proteolytischer Enzyme auf das abgetötete Bakterium. Bei der weiteren Untersuchung des Mitochondrienextraktes fanden sie, daß es sich um ein Lipoprotein handelt, das relativ hitzestabil ist und durch Lipase und Trypsin inaktiviert werden kann.

HIRSCH (1956) isolierte eine bakterizide Substanz, Phagozytin, das in Kaninchen, nicht aber in Rattenleukozyten existiert. Phagozytin ist ein Globulin, nicht dialysierbar und bis 65° hitzebeständig. Es ist aktiv gegen gramnegative Bakterien, zeigt aber geringen oder gar keinen Effekt bei grampositiven Bakterien.

COHN und HIRSCH (1960) machten Untersuchungen über die intraleukozytäre Verteilung von Phagozytin und Hydrolasen nach der Phagozytose von hitzegetöteten Bakterien. Die Verdauung einer großen Anzahl von Bakterien ging mit der 4-fachen Reduzierung des gesamten Phagozytin-Gehalts in den Leukozyten einher, während die Phagozytose die Bereitstellung von Histamin-gebundenem Bakterizidin aus dem Kern nicht beeinflusste. Bei der Untersuchung cytoplasmatischer Granula aus polymorphkernigen Kaninchen-Leukozyten war zu erkennen, daß 70 bis 80 % des gesamten antimikrobiellen Agens Phagozytin in der Granula-Fraktion enthalten ist. Ebenso sind die meisten Enzyme, wie alka-

lische und saure Phosphatasen, Hydrolasen, Nucleasen und β -Glukoronamidasen hauptsächlich in den Granula lokalisiert und bewirken die Lysis der phagozytierten Partikel (DE DUVE 1969).

CRADDOCK (1966) vermutete, daß sich die Granula in den Leukozyten nach der Phagozytose nicht mehr regenerieren können.

KLEBANOFF (1967) konnte zeigen, daß Myeloperoxidase, Jod-Ionen und H_2O_2 einen bakteriziden Effekt auf Bakterien haben. Jod konnte dabei auch durch Thyroxin oder Trijodthyronin ersetzt werden. Der bakterizide Effekt war bei einem pH-Wert von 5 hoch und fiel ab, wenn der pH-Wert stieg.

3. Die Phagozytose beeinflussende Faktoren

a) Chemische Faktoren

HELLER (1953) benutzte radioaktives, colloidales Chrom-Phosphat als Indikator, um die Funktion, Kapazität und Aktivität des RES und die Veränderung dieser Funktionen unter Einfluß von Cortison zu studieren. Er konnte eine 50 %ige Depression der funktionellen Aktivität der RES-Zellen nachweisen.

Nach JAWETZ (1973) stabilisieren Corticosterioide viele Membranstrukturen. Sie erhöhen wahrscheinlich die Stabilität lysozomaler Membranen. Diese Wirkung scheint zu der verminderten Fähigkeit der Phagozyten beizutragen, eine bakterielle Infektion bei Personen zu unterdrücken, die hohe Dosen von Corticosteroiden erhalten. THOMPSON u.a. (1970) untersuchten den Einfluß von Glucocorticosteroiden auf die Kinetik der mononukleären Phagozyten. Sie fanden eine Abnahme der Zahl der Monozyten in der Zirkulation. Glucocorticosterioide vermindern also die Entzündung durch verminderte Exudation der mononukleären Phagozyten. Die Dauer dieses Effekts auf die Monozyten ist von der Art der Glucocorticosterioide

und der Dosis abhängig. Bei der Untersuchung der polymorphkernigen Leukozyten fanden sie, daß Hydrocortison die Anzahl der polymorphkernigen Leukozyten am Anfang nicht beeinflußt, nach ein paar Tagen jedoch die Zahl beträchtlich abnimmt.

QUALLIOTINE u.a. (1972) untersuchten den Einfluß von Catecholaminen auf die bakterizide Aktivität von polymorphkernigen Leukozyten. Sie fanden, daß Epinephrin die bakterizide Aktivität der Leukozyten gegen *Sta. aureus*, *Enterobacter cloacae* und *Proteus* heftiger reduzierte, obwohl es den HMS und den Sauerstoffverbrauch aktivierte. Unterschiede in der Phagozytose von *Escherichia coli* und *Sta. aureus* erklärten sie mit der Unterschiedlichkeit der Opsonisierung und Aufnahme dieser Bakterien oder verminderter Phagozytose infolge einer Verklumpung der Bakterien. Eine Erklärung für die verminderte Phagozytose glauben sie darin zu sehen, daß das Enzym Myeloperoxidase direkt gehemmt wird, oder aber das Adrenalin konkurrierend auf Substrate der H_2O_2 -Myeloperoxidase wirkt.

b) Art der Partikel

Eine große Anzahl lebender oder toter Partikel, sowohl organischer als auch anorganischer Natur, werden phagozytiert. Folgende Substanzen haben sich dafür als geeignet erwiesen:

1. Kohlepartikel in Form der Rußdispersion C11/1431a (Fa. Günther Wagner, Pelikan Werke, Hannover).
(Methode nach BIOZZI, BENACERRAF und HALPERN 1953).
2. Chromphosphat-Teilchen mit ^{32}P markiert und in 5 % Dextrose suspendiert (WHITE 1963).
3. Eisenoxyd-Teilchen (25A), suspendiert in einer Lösung von Saccharose und Gelatine (Methode nach BENACERRAF, STIEFEL, BIOZZI und HALPERN 1954).
4. Hitzeaggregiertes Serumprotein, markiert mit ^{131}I
(Methode nach BENACERRAF, HALPERN, STIEFEL, COUCHAUD und BIOZZI 1955).

5. Methylmetacrylat-Polymerisat mit Fluoreszenzfarbstoff markiert (Methode nach JUHLIN 1956).
6. Stabilisierte kolloidale Lösung von ThO_2 (24-26 Vol. %), im Handel als Thorotrast (Methode nach GORDON und KATSH 1949).

DE CHATELET (1974) untersuchte an Hand des HMS den Einfluß von lebenden und toten Bakterien auf die Phagozytose der polymorphkernigen Leukozyten. Er fand, daß lebende Bakterien sehr viel schneller aufgenommen werden als abgetötete Bakterien. Außerdem wird die Verdauung von lebenden Bakterien außerordentlich durch die Zugabe von Serum stimuliert, während bei hitzegetöteten Bakterien eine 50 %ige Hemmung der Verdauung festzustellen ist. Bei Erhöhung des Serumzusatzes konnte er eine leicht Abnahme der Phagozytoseaktivität feststellen. Er vermutet, daß die Art des Partikels einen wesentlich subtileren Einfluß auf die Phagozytose hat, als bisher angenommen wurde.

c) Serumfaktoren

Unter den die Phagozytose beeinflussenden Faktoren spielen Einflüsse aus dem Serum eine dominierende Rolle.

WRIGHT und DOUGLAS konnten 1903 feststellen, daß gewaschene weiße Blutzellen ihre Phagozytosefähigkeit gegenüber Mikroorganismen verloren hatten, bereits aber nach Zugabe einer geringen Serummengge wieder normal phagozytierten. Sie zeigten damit, daß gewisse Serumkomponenten zur Vorbereitung der Phagozytose notwendig sind.

SOBERG und HELLIUM (1973) prüften den Einfluß von Serum auf die intrazelluläre Abtötungsrate von Bakterien durch neutrophile Granulozyten. Sie konnten eine auffällige Abnahme der abgetöteten Bakterien feststellen, wenn kein Serum zugefügt wurde. Serum bewirkte eine auffällige Steigerung der bakteriziden Aktivität bei den neutrophilen Granulozyten und zugleich eine Steigerung der intrazellulären Abtötungsrate. Der Grund für die verminderte bakterizide Aktivität der Granulozyten in Abwe-

senheit von Serum war unbekannt, man hielt aber für das Zustandekommen einer signifikanten Phagozytose die Berührung der Bakterien mit spezifischen Antikörpern (Opsoninen) für nötig.

LERNER (1956) prüfte den Einfluß auf die Phagozytose von Bakterien in Abwesenheit von Antikörpern und den Einfluß von physikalischen Oberflächenveränderungen. Er kam zu dem Ergebnis, daß bei Abwesenheit von spez. Antikörpern unter der Voraussetzung einer geeigneten physikalischen Oberfläche die Phagozytose ebenfalls stattfindet. Bei einem Vergleich zwischen Leukozyten aus dem zirkulierenden Blut und Exudat-Leukozyten hatten erstere eine höhere Phagozytose-Kapazität.

PARAPPALY und D.G. INGRAM (1973) fanden, daß die Phagozytose von gramnegativen Bakterien anstieg, wenn bei einem in vitro Test Kaninchenserum benutzt wurde, das Imunkonglutinin enthielt.

REYNOLDS (1973) prüfte die opsonisierenden Eigenschaften von IgA und IgG in einem in vitro Alveolar-Makrophagensystem auf ihren Einfluß auf die Phagozytose von *Pseudomonas aeruginosa*. Er fand, daß Bronchial-Sekret und IgG, das von immunisierten Tieren gewonnen wurde, die Phagozytose von lebenden *Pseudomonas aeruginosa* bedeutend steigerte.

d) Genetische Faktoren

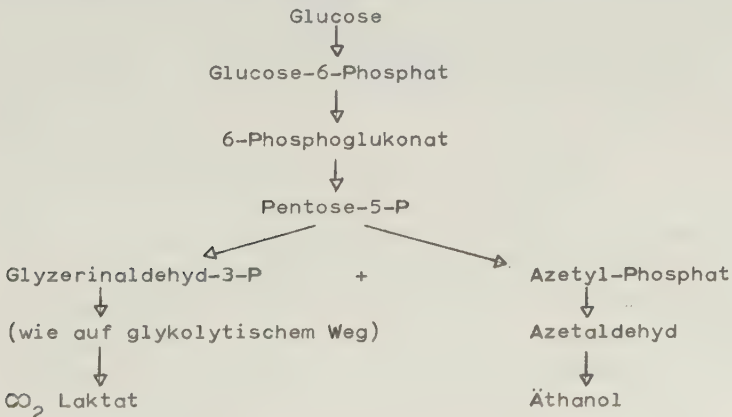
HOLMES u.a. (1967) machten Untersuchungen über die Stoffwechselaktivität von menschlichen Leukozyten, die genetische Veränderungen aufwiesen. Es war bekannt, daß Leukozyten von Menschen mit chronischer granulomatöser Erkrankung normal phagozytieren, jedoch die Bakterien intrazellulär nicht abzutöten vermögen, da die lysosomalen Granula nicht platzen und ihren Inhalt nicht freisetzen können. Die Studie zeigte, daß der Metabolismus dieser Leukozyten was Glucoseverbrauch, Laktat-Produktion, Krebs-Zyklus und Fett-Stoffwechsel betraf, normal war. Die Glucose-Oxida-

tionsrate aus C-1-¹⁴C war jedoch 20 mal geringer als bei normalen Leukozyten. Niedrige Werte beim HMS ließen auf einen Enzym-Defekt oder Mangel an NADP (der HMS wird über verfügbares NADP gesteuert) schließen. Da man zeigen konnte, daß Pyruvat und Methylenblau die C-1-¹⁴Glucose Oxidation stimulieren, indem sie NADPH oxidieren, wurde der Effekt dieser Elektronen-Akzeptoren auf die Glucose-1-¹⁴C Oxidationsrate in den Leukozyten von Menschen mit chronischer granulomatöser Erkrankung untersucht. Sowohl Methylenblau als Pyruvat bewirkten eine Normalisierung der Glucose-1-¹⁴C Oxidationsrate, was den Mangel an NADP beweist.

SELVARAJ u. a. (1967) untersuchten die metabolischen Aktivität von Leukozyten mit lymphoproliferativen oder myeloproliferativen Veränderungen während der Phagozytose. Lymphozyten von Patienten mit lymphoproliferativen Veränderungen zeigen eine metabolische Phagozytose-Stimulation. Bakterien konnten jedoch in diesen Zellen nicht festgestellt werden. Auffällig war jedoch die Abwesenheit von Partikeln um die Zelle herum, ein Phänomen, das bei Lymphozyten von gesunden Menschen nicht beobachtet werden konnte. Jedoch konnte eine Korrelation zwischen peripherer Leukozytenanzahl und metabolischer Aktivität festgestellt werden. Je höher die periphere Leukozyten-Konzentration war, desto höher war der Abfall der metabolischen Aktivität. Leukozyten von Patienten mit myeloproliferativen Veränderungen zeigen verminderte metabolische Aktivität. Patienten mit anderen neoplastischen Veränderungen, wie multiples Myelom oder Carcinom, besitzen ebenfalls Leukozyten, die eine normale metabolische Aktivität vermissen lassen.

4. Metabolismus der Bakterien

Die Fähigkeit der Mikroorganismen, die verschiedensten Verbindungen als Nahrung zu verwerten, ist groß. Nach STARKA (1968) widerstehen nur verhältnismäßig wenige natürliche oder synthetische Stoffe den mikrobiellen Enzymen. Was die Verwertung von Kohlenstoffen betrifft, so genügt einer großen Anzahl von heterotrophen Mikroorganismen eine einzige Kohlenstoffquelle, z. B. die Glucose, um hieraus alle Kohlenstoffverbindungen des Protoplasmas zu synthetisieren. Die grundlegenden Stoffwechselbahnen, wie Glykolyse, der terminale Tricarbonsäurezyklus, der Hexose-Monosphatweg und weitere andere, haben auch bei den Bakterien weitreichende Gültigkeit. Es hängt von den Umständen im Inneren der Zelle ab, ob ein Glucose-6-Phosphat-Molekül in Fruktose-6-Phosphat, in Phosphoglukonsäure, in Glucose-1-Phosphat oder in Glucose und Phosphat überführt wird. Nach HOLLMANN (1964) läßt sich der Pentosezyklus der Mikroorganismen wie folgt darstellen:



Die Beziehung zwischen oxidativem Stoffwechsel und anaerober Dissimilation der Zucker ist bei fakultativ anaeroben Mikroorganismen, besonders bei Organismen, die außer der oxidativen auch eine fermentative Enzymausstattung haben, deutlicher als bei *E.coli*, *Aerob. aerogenes* und Hefen. Sie spalten Hexosen unter anaeroben Bedingungen vorwiegend auf dem glykolytischen Wege in Übereinstimmung mit dem Emden-Meyerhof-Weg. Unter aeroben Bedingungen überwiegt der Hexose-Monophosphat-Zyklus. Außer dem Emden-Meyerhof-Weg und dem direkten oxidativen Abbau können nach JAWETZ (1973) viele Mikroben Hexose über den Enter-Dondoroff-Weg abbauen (Zuerst bei *Pseudomonas saccharophila* gefunden).

Enter-Dondoroff-Weg

Glucose-6-Phosphat $\longrightarrow$ 6-Phosphogluconat $\longrightarrow$ 2-Keto-3-desoxy
6-Phosphogluconat $\longrightarrow$ Pyruvat + Glycerinaldehyd-I-Phosphat

Ob während der Phagozytose die Phagozyten die aufgenommenen Mikroben abtöten oder aber ihr Überleben verlängern und sogar ihre intrazelluläre Vermehrung begünstigen, hängt teils von den Eigenschaften der Phagozyten, teils von der Art der Mikrobe ab.

III. MATERIAL UND METHODIK

1. Versuchstiere

Für die Versuche stand ein weibliches deutsches Landschwein, ca 1 1/2 Jahre alt, zur Verfügung. Das Tier hatte während der Versuchszeit einen Wurf von 9 Ferkel; ein weibliches und ein männliches Tier aus diesem Wurf standen von der Geburt an bis zum 4. Lebensmonat ebenfalls zur Verfügung. Für Vergleichsmessungen konnte Blut von einem weiteren weiblichen deutschen Landschwein, ca 2 Jahre alt, gewonnen werden.

2. Blutgewinnung und -behandlung

Als Antikoagulans diente eine Heparinlösung, die unter sterilen Bedingungen aus Heparin-Natriumsalz (130.000 IE/g) in einer Verdünnung von 1 : 1.000 mit einer NaCl-Lösung hergestellt wurde. Zur Ungerinnbarmachung von 10 ml Blut diente 0,5 ml Heparinlösung. Das Blut wurde am jeweiligen Versuchstag aus der vena jugularis in silikonisierten Blutentnahmeröhrchen aufgefangen. Bis zur Verwendung wurden die Röhrchen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

3. Verwendete Medien

Eine auf pH 7,4 eingestellte Hank's Salzlösung diente zur Lösung von Glucose-1-¹⁴C und Glucose-6-¹⁴C, die eine spezifische Aktivität von 3 μ Ci/mmol hatten. Da je 3 mg Glucose-1-¹⁴C und Glucose-6-¹⁴C in 560 ml HBSS aufgelöst wurden, hatte 1 ml der Lösung eine spezifische Aktivität von 0,0893 μ Ci.

4. Zur Phagozytose angebotene Partikel

a) Inerte Polystyren-Latex Partikel ($\phi = 0,8 \mu\text{m}$).

Sie wurden unter sterilen Bedingungen mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine Konzentration von $2 \times 10^9/\text{ml}$ eingestellt.

b) Bakterien

Erysipelothrix insidiosa ER IX Ffm

Escherichia coli (hämolyisierend) H11

Escherichia coli (nicht hämolyisierend) H13

Staphylococcus aureus S 15 (koagulase positiv)

Staphylococcus epidermidis ATCC 10875

Pseudomonas aeruginosa S7

Streptococcus zooepidemicus

Die Bakterien wurden je nach Wuchsstärke 1 oder 2 Tage in Glucoselösung bei 37°C gezüchtet. Das im Zentrifugenröhrchen gewonnene Sediment wurde zweimal in NaCl gewaschen (10 Minuten bei 200 g). Im Photometer wurde bei 400 nm eine Bakteriendichte von $2 \times 10^8/0,1 \text{ ml}$ mit Hilfe einer Eichkurve eingestellt.

5. Seren

Zur Verwendung kamen tiefgefrorene Seren von Mensch, Pferd, Rind, Schwein, Ziege und Hahn. Eine Inaktivierung der Seren wurde durch 30-minütiges Erhitzen bei 56°C im Wasserbad erreicht.

6. Verwendete Zusätze

Lipopolysaccharid (LPS) von *Klebsiella* sp. wurde in PBS gelöst und auf eine Konzentration von $0,083 \text{ mg/ml}$ eingestellt.

Hydrocortisonacetat (Hoechst); $25 \text{ mg Krystallsuspension/ml}$
Dextran MG 20.000 - MG 40.000 - MG 1 Mio.

Zusammensetzung der HBSS:

NaCl	160 g
Kaliumchlorid (KCl)	8 g
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$)	2 g
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$)	2 g
Kalziumchlorid ($\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$)	2,2 g
Aqua dest	ad 1000 ml

Um das während der Reaktionszeit in den verschlossenen Erlenmeyerkolben entstandene $^{14}\text{CO}_2$ aufzufangen, wurde eine Hyamin 10X-Hydroxid-1M-Lösung in Methanol (Serva, Heidelberg) benutzt.

Als Scintillationsflüssigkeit diente Fluoralloy-TLA (Beckman Instruments). 32,2 g TLA Dry Mix wurden in einer Gallone (= 3,785 l) Toluol aufgelöst; die Konzentration betrug so 8,0 g/l Butyl PBD und 0,5 g/l PBBO.

Zusammensetzung von PBS:

pH = 7,4

Aqua dest	1000,00 ccm
NaCl	8,00 gr
Kaliumchlorid	0,20 gr
Natriumphosphat (Na_2HPO_4)	1,15 gr
Kaliumphosphatprim (KH_2PO_4)	0,20 gr
Calciumchlorid (CaCl_2)	0,10 gr
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	0,10 gr

7. Methodik

Glucosestoffwechsel:

Nach KEUSCH u.a. (1971 und 1972) werden in einem 25 ml silikonisierten Spezialerlenmeyerkolben, in dessen Boden ein Ring zur Aufnahme eines kleinen Glasgefäßes eingeschmolzen ist, 0,1 ml der Partikelsuspension von der Konzentration $2 \times 10^9/\text{ml}$, 1 ml Hank's-Lösung, enthaltend $0,0625 \mu\text{Ci}$ Glucose-1- ^{14}C bzw. Glucose-6- ^{14}C und 0,2 ml Vollblut bzw. gewaschenes Blut gegeben. Die Kolben werden mit Gummikappen verschlossen und 30 Minuten bei 37° geschüttelt. Danach werden durch die Gummikappe 1 ml 2 N Salzsäure in die Erlenmeyerkolben und 0,4 ml Hyamin-10X-Hydroxid in den Glasbecher am Boden des Erlenmeyerkolbens injiziert. Nach erneuten 30-Minuten-Bebrüten bei 37° , währenddessen das entstandene $^{14}\text{CO}_2$ vom Hyaminhydroxid aufgefangen wird, werden die Glasbecher mit der Hyaminhydroxidlösung in Meßfläschchen mit 10 ml Szintillatorlösung (Fluor-alloy-TLA in Toluol, Beckman ^R) gebracht und die Radioaktivität in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler (Searle) gemessen.

Phagozytose-Test:

Die Phagozytose von Bakterien wurde ermittelt, indem die Leukozytenaufnahme von radioaktiv markierten Organismen gemessen wurde. Für diesen Zweck wurden die Bakterien über Nacht bei 37° in einer Nährstofflösung, die $50 \mu\text{Ci}$ von einheitlich markiertem ^{14}C -Proteinhydrolysat enthielt, inkubiert. Die Bakterien wurden fünfmal in NaCl gewaschen und auf eine Standardkonzentration von $2 \times 10^8/\text{ml}$ eingestellt. Die Leukozyten wurden aus Schweineblut gewonnen, indem 50 ml Haemaccel (Behringwerke, Marburg) zu 100 ml heparinisiertem Blut hinzugefügt wurden, dies bei 37° 90 Minuten inkubiert und schwach zentrifugiert wurde. Der leukozytenreiche

Überstand wurde abgenommen und das Sediment mit 5×10^6 Zellen/ml in PBS resuspendiert. 1 ml der Bakteriensuspension wurde 10 Minuten bei 37° mit der gleichen Menge Serum von verschiedenen Tieren oder mit PBS inkubiert. Dann wurde 1 ml von der Leukozytensuspension zugefügt und 20 Minuten bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 4 ml 0,04 M Natriumfluorid in PBS gestoppt. Die Zellen wurden bei 800 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Pellet wurde von nicht verdauten Bakterien gereinigt, indem es in 5 ml 0,01 M Natriumfluorid in PBS, das 5 % fetales Kälberserum enthielt, suspendiert wurde. Nach drei solcher Waschvorgänge wurde das Pellet über Nacht in ein 60° heißes Wasserbad gestellt und dann während 4 Stunden in 0,5 ml einer 0,2 N NaOH gelöst. Die Lösung wurde mit 3 % Essigsäure neutralisiert, 0,5 ml destilliertes Wasser hinzugefügt und 1 ml davon wurde in 10 ml Unisolve 1 (Koch-Light Lab. Ltd) gegeben. In einem Scintillations-Spektrometer wurden die Impulse pro Minute ermittelt.

IV. ERGEBNISSE

1. Messung des Glucose-1-¹⁴C Stoffwechsels

Da die Vermutung nahe lag, daß bei der Messung der Phagozytoseaktivität mittels der Glucose-1-¹⁴C Oxidationsrate der Glucose-1-¹⁴C Metabolismus der Bakterien in die Meßwerte miteingehen würde, wurden getrennte Messungen (siehe Tabelle 1) durchgeführt. Der Verdacht bestätigte sich; der Glucose-1-¹⁴C Stoffwechsel der Bakterien spiegelte sich zu einem gewissen Prozentsatz in den erhaltenen Meßwerten wieder. Bei allen folgenden Messungen, bei denen den Leukozyten lebende Bakterien zur Phagozytose angeboten wurden, ist der prozentuale Anteil der Leukozyten am Glucose-1-¹⁴C Metabolismus bereits berücksichtigt.

Tabelle 1: Messung des Glucose-1-¹⁴C Stoffwechsels

- a) von Schweineleukozyten unter Zusatz von lebenden Bakterien
 b) von lebenden Bakterien
 cpm-Werte sind angegeben

Partikel	Vollblut + lebende Bakt.	Lebende Bakt.	prozentualer Anteil der Leukozyten an der Glucose-1- ¹⁴ C Oxid.-Rate
Ps. aeruginosa	1579,5	681,7	56,8 %
E. coli H13	1936,8	761,1	60,7 %
E. coli H11	1596,2	678,0	57,5 %
Sta. epidermidis	686,8	322,3	53,1 %
Str. zooepidemicus	426,5	36,2	91,5 %
E. insidiosa	417,6	52,9	87,3 %
Sta. aureus	1038,9	763,9	73,5 %

cpm = counts per minute

2. Einfluß der Art des angebotenen Partikels auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus während der Phagozytose

Tabelle 2: Glucose-1-¹⁴C Metabolismus in Schweineleukozyten während der Verdauung verschiedener Bakterien und Latex Partikel. Der Durchschnitt jedes Wertes ist aus 6 Messungen $\pm$ Standardabweichung errechnet

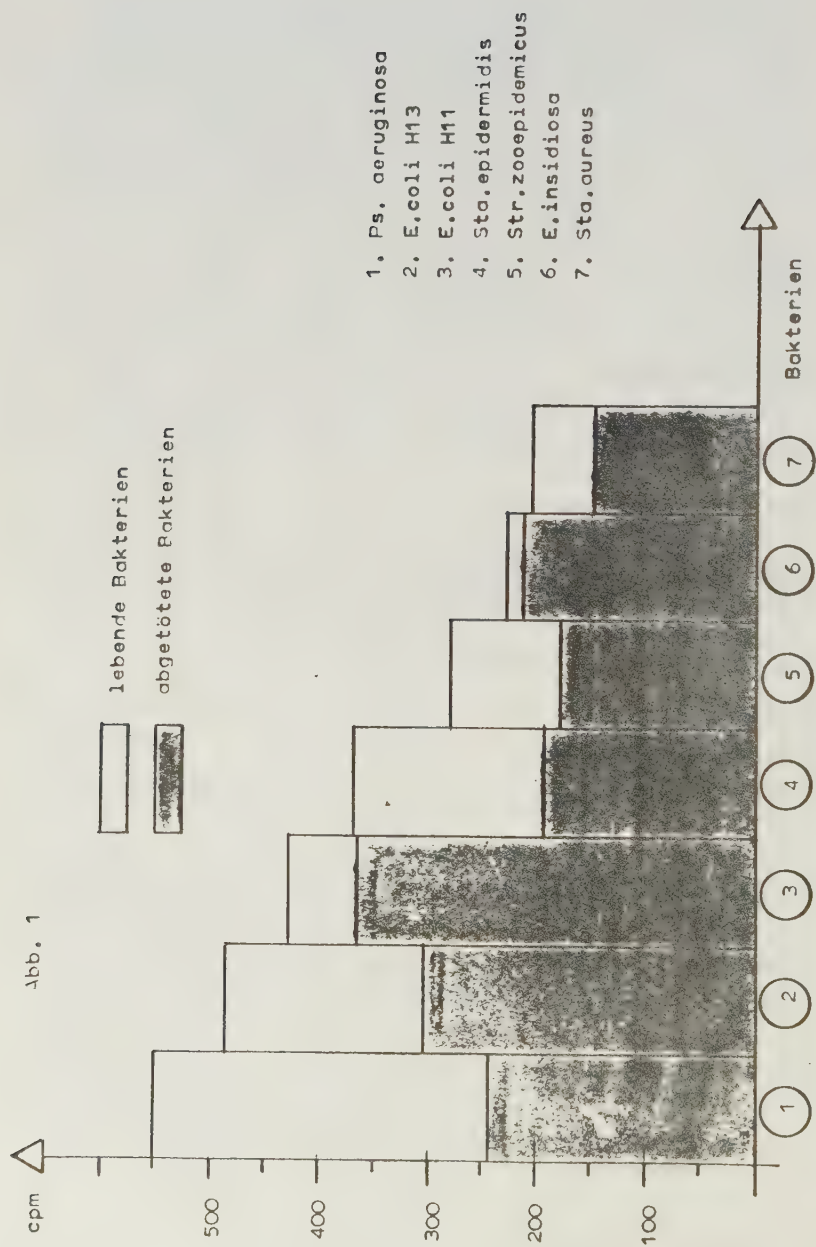
Partikel	Lebende Bakterien		P/R.	hitzegetötete Bakt.		P/R.
	cpm $\pm$ s			cpm $\pm$ s		
Ps. aeruginosa	550,0 $\pm$ 93,5	7,8		242,8 $\pm$ 8,7	3,9	
E.coli H13	480,5 $\pm$ 36,2	6,8		304,1 $\pm$ 21,6	4,6	
E.coli H11	428,7 $\pm$ 34,8	6,1		365,1 $\pm$ 54,1	5,9	
Sta. epidermidis	368,3 $\pm$ 23,3	5,2		193,1 $\pm$ 11,0	3,1	
Str. zooepidemicus	277,9 $\pm$ 56,4	3,9		177,0 $\pm$ 26,6	2,9	
E.insidiosa	227,8 $\pm$ 40,0	3,2		213,8 $\pm$ 23,5	3,4	
Sta. aureus	205,9 $\pm$ 16,9	2,9		148,1 $\pm$ 10,0	2,4	
Latex	85,9 $\pm$ 6,4	1,2				
Kontrolle ohne Partikel	70,4 $\pm$ 12,8			61,9 $\pm$ 5,6		

cpm = count per minute

P/R = Verhältnis von phagozytierenden zu ruhenden Zellen

Die Ergebnisse von Tabelle 2 lassen vermuten, daß gramnegative Bakterien den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus der Phagozyten stärker stimulieren als grampositive Bakterien. Eine signifikante Verminderung des Glucose Metabolismus tritt auf, wenn hitzegetötete Bakterien zugefügt werden.

Abb. 1: Vergleich der Ausscheidungsmenge von ¹⁴CO₂ aus Glucose-1-¹⁴C in cpm von phagozytierenden Schweineleukozyten bei Zusatz von lebenden bzw. abgetöteten Bakterien.



3. Messung des Glucose-6-¹⁴C Stoffwechsels

Bei dieser Messung wurde untersucht, inwieweit der Glucose-6-¹⁴C Metabolismus bei der Phagozytose von Bakterien durch neutrophile Granulozyten eine Rolle spielt.

Tabelle 3: Messung des Glucose-6-¹⁴C Metabolismus

- a) von Schweineleukozyten während der Verdauung von lebenden Bakterien
 - b) von Schweineleukozyten während der Verdauung von hitzegetöteten (30 Minuten 70°) Bakterien
 - c) der getesteten Bakterien
- cpm-Werte sind angegeben

Partikel	Vollblut + lebende Bakt.	Vollblut + abgetötete Bakterien	Bakterien
Ps. aeruginosa	508,5	27,3	514,1
E.coli H13	140,6	28,8	110,6
E.coli H11	155,4	27,5	125,0
Sta. epidermidis	41,0	35,5	47,7
Str.zooepidemicus	34,8	31,3	30,4
E.insidiosa	34,2	34,8	28,9
Sta. aureus	59,1	26,9	91,5
Kontrolle ohne Partikel	30,3	26,4	

cpm = counts per minute

Wie aus Tabelle 3 zu ersehen ist, verfügen die Bakterien (vor allem die gramnegativen) über einen Glucose-6-¹⁴C Metabolismus, während dieser Stoffwechselweg bei den phagozytierenden Leukozyten kaum in Erscheinung tritt.

4. Reproduzierbarkeit der bisher erhaltenen Ergebnisse

Getestet wurde das Blut eines anderen weiblichen Schweines. Folgende Ergebnisse lassen sich, wie aus Tabelle 4 und 5 ersichtlich ist, reproduzieren:

- 1) Die Phagozyten werden in ihrem Glucose-1- ^{14}C Metabolismus durch verschiedene Bakterien unterschiedlich stark stimuliert.
- 2) Bei Zusatz von hitzegetöteten Bakterien tritt eine Verminderung des Glucose-1- ^{14}C Metabolismus auf.
- 3) Der Glucose-6- ^{14}C Metabolismus der Phagozyten wird durch den Zusatz von abgetöteten Bakterien nicht aktiviert.

Tabelle 4: Glucose-1- ^{14}C Metabolismus; cpm-Mittelwerte aus zwei Messungen

Partikel	Vollblut + lebende Bakterien		Vollblut + abgetötete Bakterien	
	cpm $\pm$ s	P/R	cpm $\pm$ s	P/R
<i>Ps.aeruginosa</i>	771,9 $\pm$ 138,9	7,2	559,9 $\pm$ 30,7	5,2
<i>E.coli</i> H13	779,4 $\pm$ 70,1	7,2	458,1 $\pm$ 37,1	4,3
<i>E.coli</i> H11	633,7 $\pm$ 45,5	5,9	559,9 $\pm$ 77,8	5,2
<i>Sta.epidermidis</i>	534,0 $\pm$ 36,8	4,9	458,1 $\pm$ 27,5	4,3
<i>Str.zooepidemicus</i>	406,6 $\pm$ 66,7	3,8	407,2 $\pm$ 59,0	3,8
<i>E.insidiosa</i>	383,0 $\pm$ 69,3	3,6	356,3 $\pm$ 40,9	3,3
<i>Sta. aureus</i>	289,2 $\pm$ 22,8	2,7	152,7 $\pm$ 17,2	1,4
Latex	107,0 $\pm$ 7,9	1,0		
Kontrolle ohne Partikel	107,0			

cpm = counts per minute

P/R = Verhältnis von phagozytierenden zu ruhenden Zellen

Abb.2: Vergleich der Ausscheidungsmenge von $^{14}\text{CO}_2$ aus Glucose-1- ^{14}C , gemessen in cpm, von phagozytierenden Schweineleukozyten bei Zusatz von lebenden bzw. abgetöteten Bakterien.

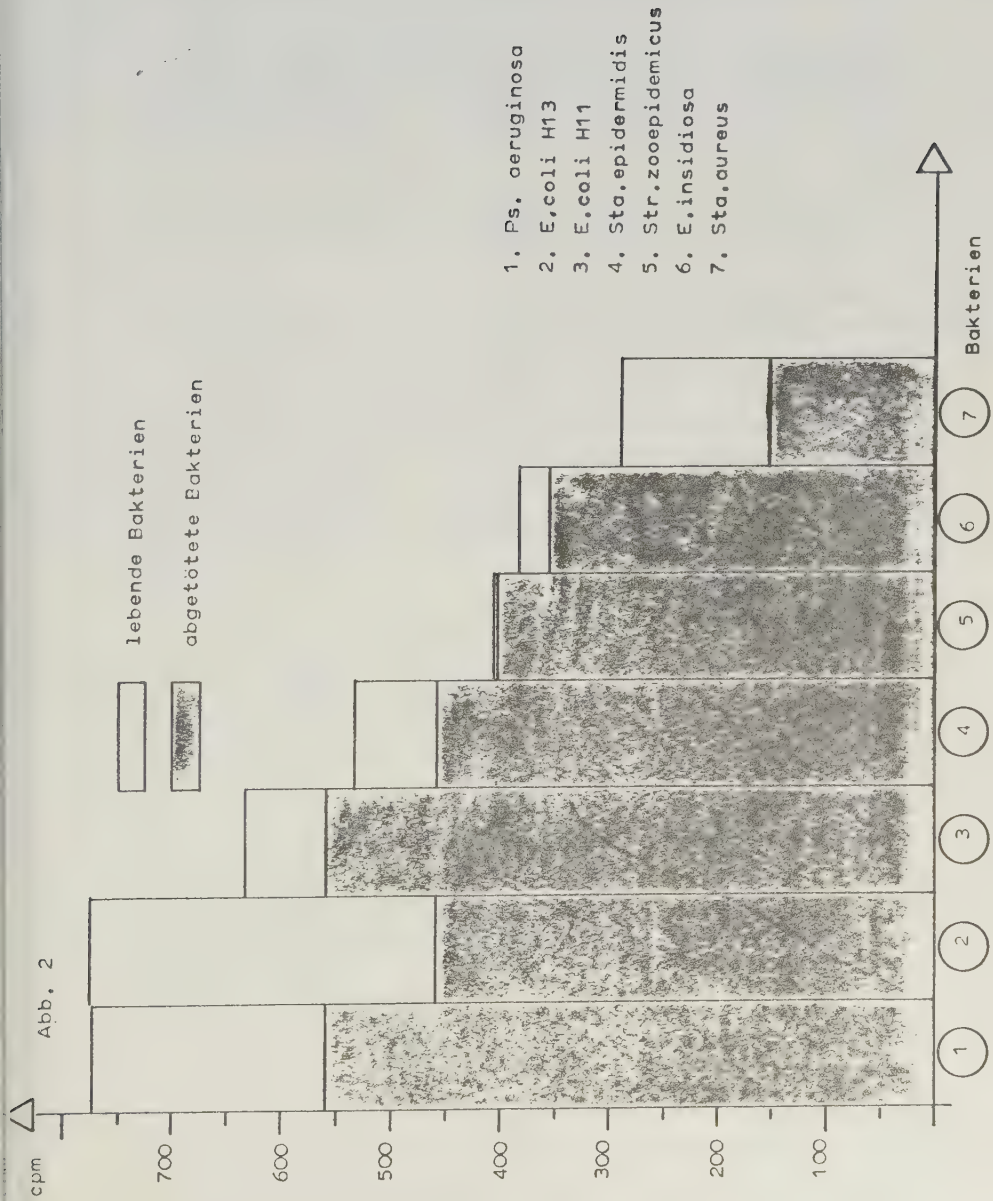


Tabelle 5: Glucose-6-¹⁴C Metabolismus; cpm-Mittelwerte
aus zwei Messungen

Partikel	Vollblut + abgetötete Bakterien	
	cpm	P/R
<i>Ps. aeruginosa</i>	36,9	1,0
<i>E.coli</i> H13	38,0	1,0
<i>E.coli</i> H11	57,0	1,5
<i>Sta.epidermidis</i>	30,4	0,8
<i>Str.zooepidemicus</i>	38,0	1,0
<i>E.insidiosa</i>	30,4	0,8
<i>Sta.aureus</i>	38,0	1,0
Latex	30,4	0,8
Kontrolle ohne Partikel	38,0	

cpm = counts per minute

P/R = Verhältnis von phagozytierenden zu ruhenden Zellen

5. Einfluß der Anzahl der Partikel auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus

Bei diesem Versuch wurde nach einem Zusammenhang zwischen Partikelkonzentration und aktivierten Glucose-Stoffwechsel gesucht.

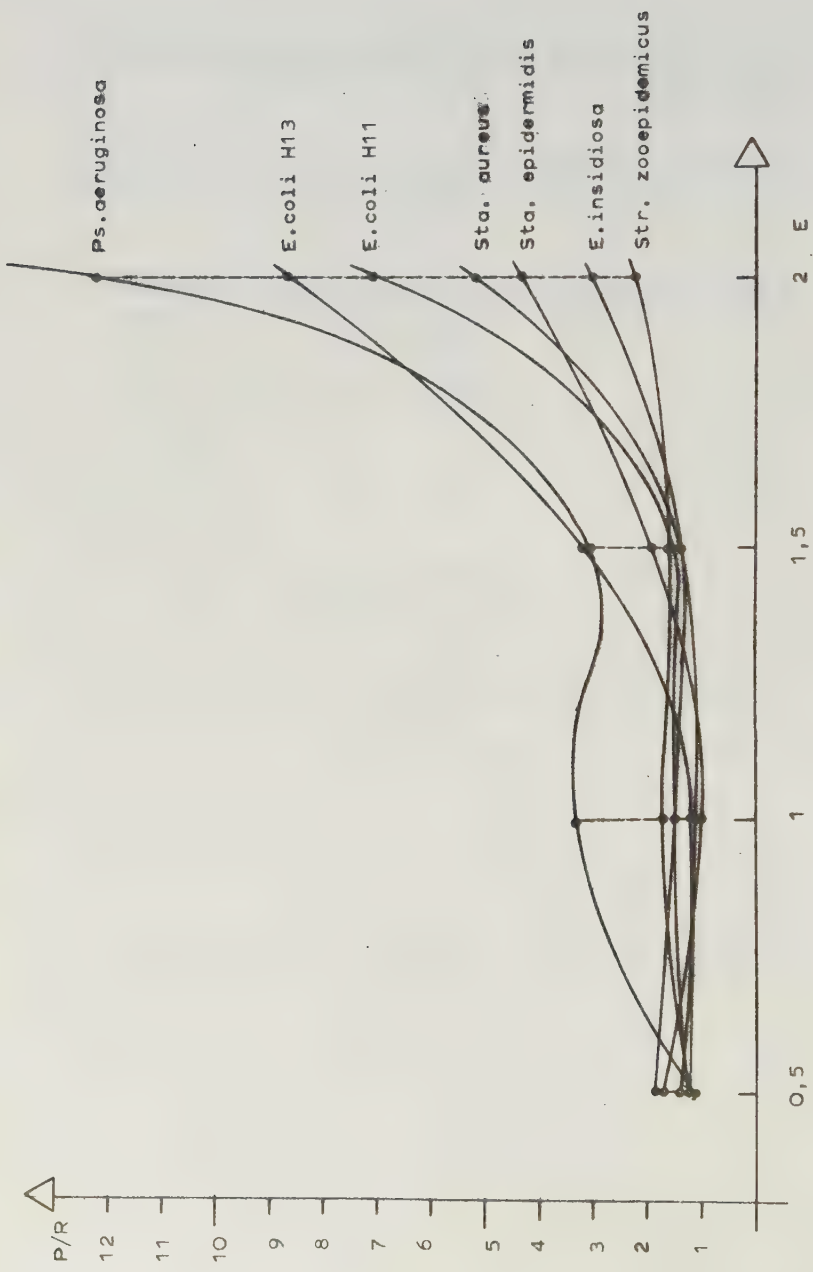
Tabelle 6: P/R-Werte bei verschiedenen Partikelkonzentrationen von lebenden Bakterien

Partikel	E = 0,5	E = 1,0	E = 1,5	E = 2,0
<i>Ps. aeruginosa</i>	1,1	3,3	3,0	12,3
<i>E.coli</i> H13	1,4	1,2	3,1	8,7
<i>E.coli</i> H11	1,2	1,5	1,5	7,1
<i>Sta.epidermidis</i>	1,7	1,0	1,9	4,3
<i>Str.zooepidemicus</i>	1,2	1,7	1,5	2,2
<i>E.insidiosa</i>	1,8	1,5	1,4	3,0
<i>Sta. aureus</i>	1,2	1,1	1,4	5,2

P/R = Verhältnis der phagozytierenden zu den ruhenden Zellen
 E = Extinktion gemessen bei 400 nm

Tabelle 6 und Abb. 3 zeigen die Dosis-Wirkungskurve der Glucose-1-¹⁴C Oxidation von jeweils gleicher Leukozytensuspension aber mit veränderter Bakterienkonzentration. Es zeigt sich, daß ab einer bestimmten Partikelkonzentration die P/R-Werte exponential ansteigen. In allen anderen sonst durchgeführten Messungen wurde eine Konzentration von 2×10^9 Bakterien/ml verwendet; so treffen auf einen Granulozyt ca 200 Partikel.

Abb. 3



Dosis-Wirkungskurve der Glucose-1-¹⁴C Oxidation bei der Phagozytose von lebenden Bakterien

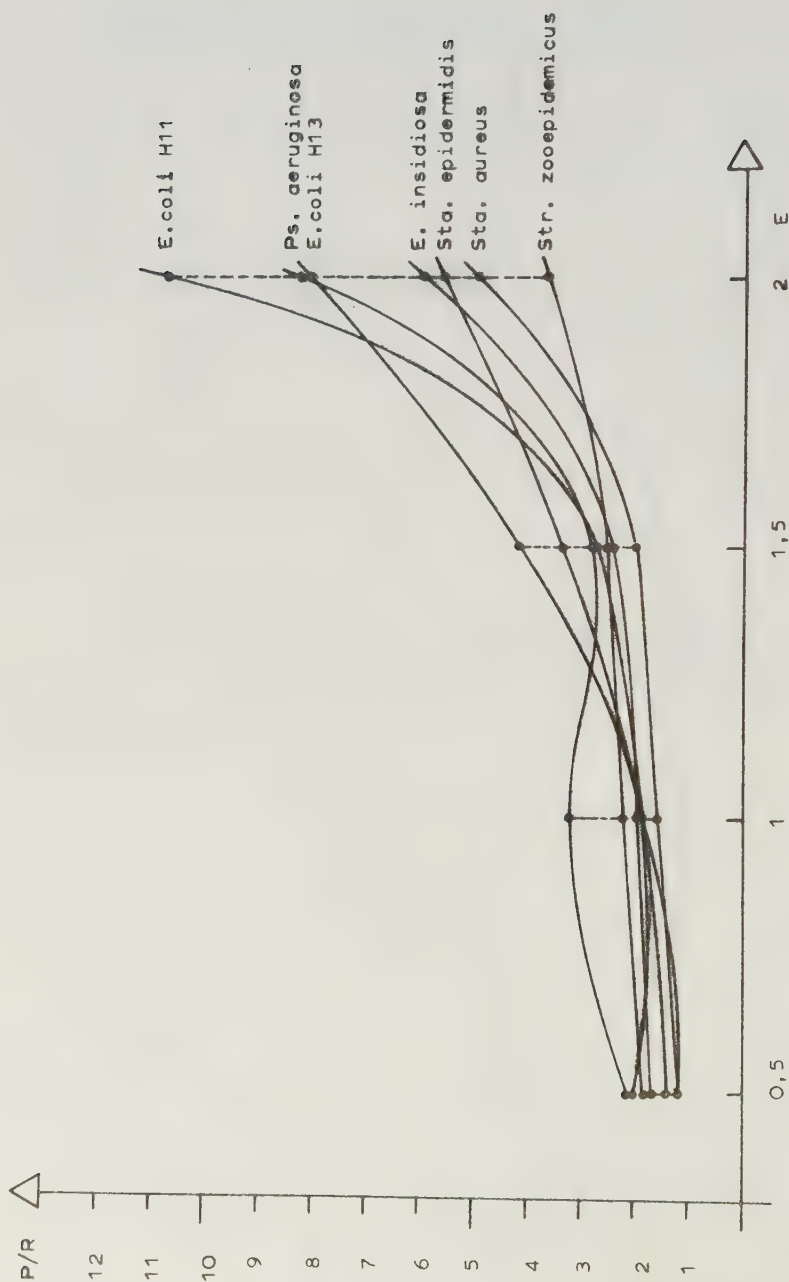
Tabelle 7: P/R-Werte bei verschiedenen Konzentrationen
von abgetöteten Bakterien (30 Minuten 70°)

Partikel	E = 0,5	E = 1,0	E = 1,5	E = 2,0
<i>Ps.aeruginosa</i>	2,1	3,2	2,8	8,3
<i>E.coli</i> H13	2,0	1,8	4,2	8,2
<i>E.coli</i> H11	1,4	1,8	2,7	10,8
<i>Sta.epidermidis</i>	1,2	1,8	3,4	5,6
<i>Str.zooepidemicus</i>	1,8	2,2	2,6	3,7
<i>E.insidiosa</i>	1,7	1,9	2,5	6,0
<i>Sta. aureus</i>	1,2	1,6	2,0	5,0

P/R = Verhältnis der phagozytierenden zu den ruhenden Zellen

E = Extinktion gemessen bei 400 nm

Aus Tabelle 7 und Abb. 3 und 4 ist ersichtlich, daß der Glucosestoffwechsel während der Phagozytose durch gram-negative Bakterien am stärksten stimuliert wird.



6. Einfluß der Inkubationszeit auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus während der Phagozytose

Bei dem Standardversuchsansatz wurde eine Reaktionszeit von 30 Minuten eingehalten und die Reaktion durch die Hinzufügung von 2 N HCl gestoppt. Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob die ¹⁴CO₂ Produktion nach dieser Zeit beendet ist, oder ob der Glucose-Metabolismus und damit die Phagozytose noch weiter andauern.

Tabelle 8: Glucose-1-¹⁴C Metabolismus bei der Phagozytose von lebenden Bakterien während der Inkubationsdauer von 15, 30 und 90 Minuten
P/R-Werte sind angegeben

Partikel	15'	30'	60'	90'
<i>Ps. aeruginosa</i>	3,63	5,16	5,68	5,05
<i>E.coli</i> H13	2,79	5,46	6,79	7,52
<i>E.coli</i> H11	3,22	5,06	6,09	8,51
<i>Sta.epidermidis</i>	2,86	3,92	3,61	3,18
<i>Str.zooepidemicus</i>	3,20	3,74	4,84	3,11
<i>E.insidiosa</i>	2,53	3,05	4,10	3,14
<i>Sta. aureus</i>	1,48	1,53	2,06	2,99

P/R = Verhältnis der phagozytierenden zu den ruhenden Zellen

Tabelle 8 und Abb. 5 zeigen den Einfluß unterschiedlicher Inkubationszeit auf die Glucose-1-¹⁴C Oxidationsrate von Schweineleukozyten während der Phagozytose von lebenden Bakterien.

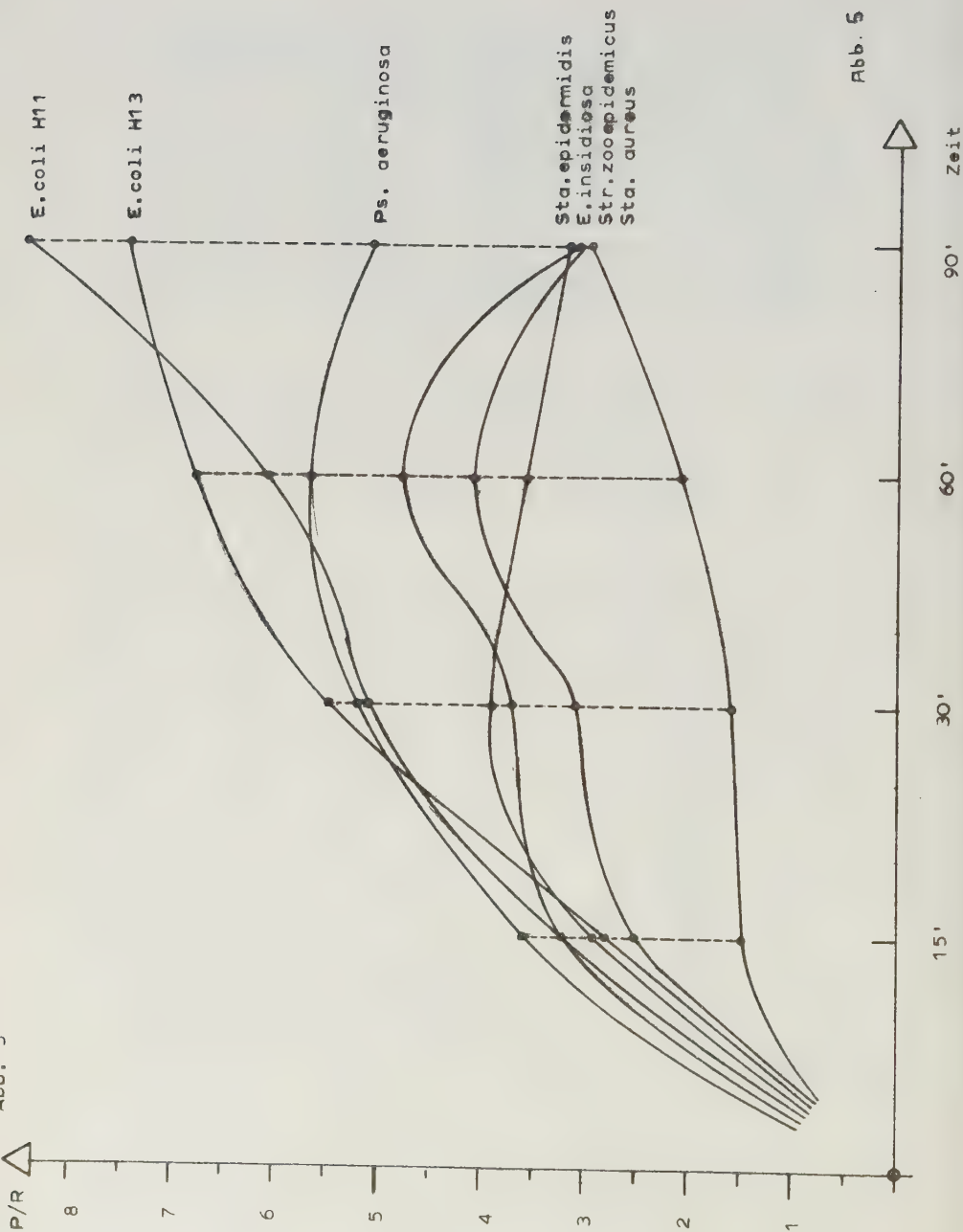


Abb. 5

Tabelle 9: Glucose-1-¹⁴C Metabolismus bei der Phagozytose von abgetöteten Bakterien (30 Minuten 70°) während der Inkubationsdauer von 15, 30, 60 und 90 Minuten
P/R-Werte sind angegeben, jeder Wert gibt das Ergebnis von 3 Experimenten wieder

Partikel	15'	30'	60'	90'
Ps. aeruginosa	1,26	3,24	3,58	4,98
E.coli H13	3,43	6,31	6,56	5,89
E.coli H11	4,03	5,65	5,97	6,66
Sta.epidermidis	4,01	4,17	6,72	6,09
Str.zooepidemicus	4,37	5,09	5,35	4,57
E.insidiosa	3,33	4,70	6,28	4,82
Sta. aureus	3,05	3,80	4,52	3,20
Latex	1,23	2,18	2,75	2,88

P/R = Verhältnis der phagozytierenden zu den ruhenden Zellen

Tab. 9 und Abb. 6 zeigen den Einfluß unterschiedlicher Inkubationszeit von Schweineleukozyten während der Phagozytose von abgetöteten Bakterien.

Dasselbe Ergebnis wie bei der Phagozytose von lebenden Bakterien zeichnet sich ab; die Reaktion läuft über einen Zeitraum von mindestens 60 Minuten.

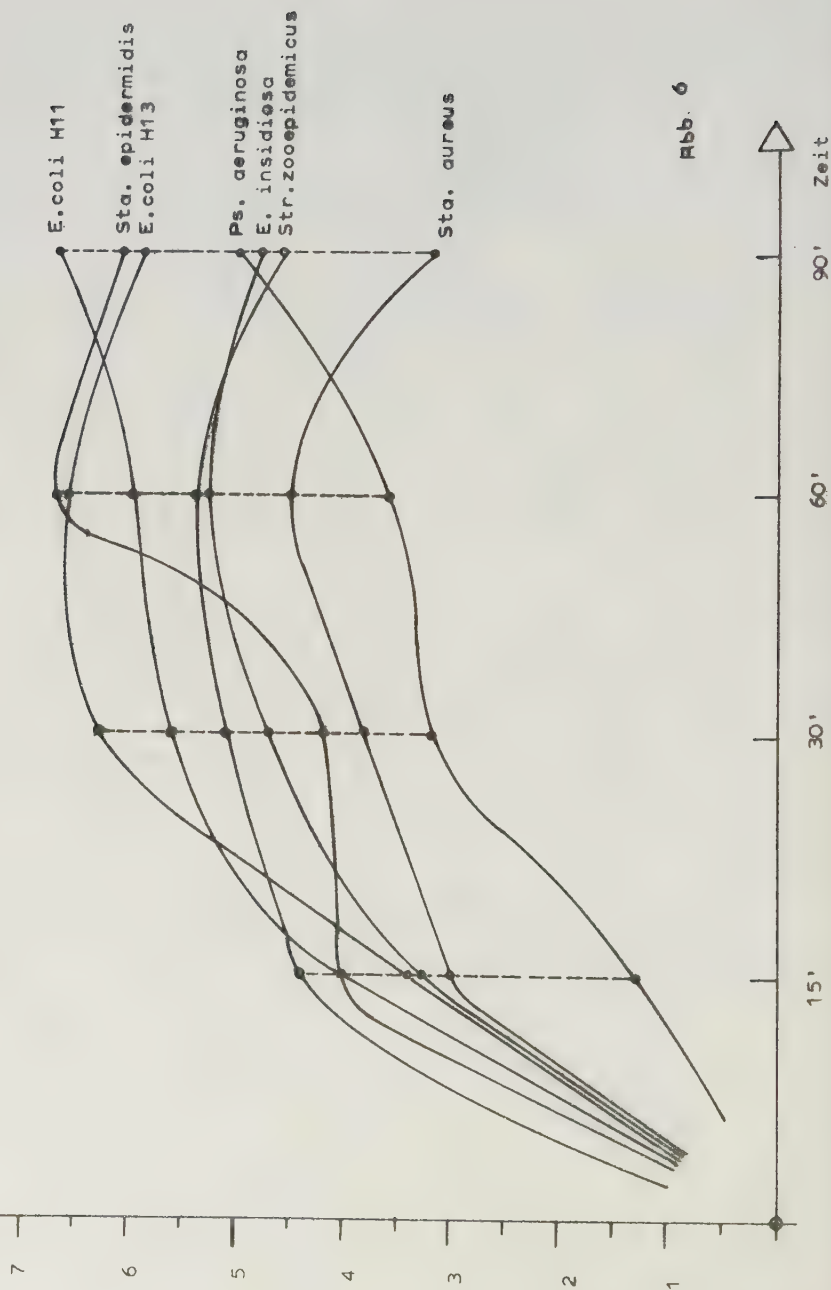


Abb. 6

7. Einfluß verschiedener Serumzusätze auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus während der Phagozytose

In diesem Versuch wurde Schweineblut 5 mal in NaCl gewaschen und dann in der gleichen Menge von Hank's-Lösung und Serum verschiedener Tiere resuspendiert, wobei der Serumanteil 1/3 Vol. % betrug. Geprüft wurde das Serum von Mensch, Schwein, Kuh, Ziege, Pferd und Hahn.

Wie aus Tabelle 10 und 11 ersichtlich ist, konnte kein signifikanter Effekt auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus von Schweineleukozyten während der Phagozytose verschiedener Partikel festgestellt werden, wenn Serum anderer Tierarten zugesetzt wurde.

Tabelle 10: Einfluß eines Serumzusatzes auf den Glucosetoffwechsel während der Phagozytose
cpm-Werte sind angegeben

Partikel	Serum Mensch	autolog. Schweine Serum	homolog. Schweine Serum	Serum Kuh	Serum Ziege	Serum Pferd	Serum Hahn
<i>Ps. aeruginosa</i>	313,5	634,5	373,7	401,0	615,6	661,7	552,1
<i>E.coli</i> H13	379,4	558,4	522,0	356,9	576,6	517,2	344,2
<i>E.coli</i> H11	343,8	473,1	470,2	464,9	399,5	514,6	349,0
<i>Sta.epidermidis</i>	296,3	448,7	313,2	374,7	381,9	398,3	n.t.
<i>Str.zooepidemicus</i>	285,5	456,6	240,8	134,5	419,8	129,8	n.t.
<i>E.insidiosus</i>	184,3	225,0	205,2	205,1	195,3	157,2	n.t.
<i>Sta.aureus</i>	173,0	239,5	232,9	139,9	239,8	211,8	193,4
Latex	82,2	119,0	79,9	73,5	n.t.	174,1	86,4
Kontrolle ohne Partikel	82,0	118,0	102,0	82,0	105,0	106,0	85,0

cpm = counts per minute

Tabelle 11: Einfluß eines Serumzusatzes auf den Glucosestoffwechsel während der Phagozytose
P/R-Werte sind angegeben

Partikel	Serum Mensch	autolog. Schweine Serum	homolog. Schweine Serum	Serum Kuh	Serum Ziege	Serum Pferd	Serum Hahn
<i>Ps. aeruginosa</i>	3,8	5,3	3,7	4,9	5,7	6,2	6,1
<i>E.coli</i> H13	4,6	4,7	5,1	4,3	5,4	4,9	4,1
<i>E.coli</i> H11	4,2	3,8	4,6	5,6	3,8	4,8	4,1
<i>Sta.epidermidis</i>	3,6	3,7	3,0	4,5	3,6	3,7	n.t.
<i>Str. zooepidemicus</i>	3,5	3,8	2,4	1,7	4,0	1,2	n.t.
<i>E. insidiosa</i>	2,2	1,9	2,0	2,5	1,9	1,5	n.t.
<i>Sta. Aureus</i>	2,1	2,0	2,2	1,7	2,2	2,0	2,0
Latex	1,0	1,0	0,8	1,0	n.t.	0,7	1,0

P/R = Verhältnis der phagozytierenden zu den ruhenden Zellen

n.t. = nicht untersucht

8. Einfluß von aktivem bzw. inaktiviertem Serum auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus während der Phagozytose

Um den Einfluß einer Hitzeinaktivierung zu studieren, wurde ein Teil des Serums 30 Minuten im Wasserbad (56°) inaktiviert.

Tabelle 12: Einfluß einer Hitzeinaktivierung von Serum auf den Glucose-1-¹⁴C Stoffwechsel während der Phagozytose.
cpm-Werte sind angegeben

Partikel	autologes Serum Schwein		homologes Serum Schwein		Serum Kuh	
	aktiv	inakt.	aktiv	inakt.	aktiv	inakt.
Ps. aeruginosa	634,5	951,0	373,7	282,9	401,0	629,0
E.coli H13	558,4	435,5	522,0	544,9	356,9	461,0
E.coli H11	473,1	467,6	470,2	524,3	464,9	405,3
Sta.epidermidis	448,7	450,1	313,2	384,7	374,7	356,5
Str.zooepidemicus	456,6	459,6	240,8	210,7	135,5	134,5
E.insidiosa	425,2	396,7	205,2	239,5	205,1	209,6
St.aureus	239,5	263,0	232,9	193,0	138,9	242,8

cpm = counts per minute

Wie aus Tabelle 12 zu ersehen ist, unterscheiden sich die cpm-Werte bei Verwendung von aktivem bzw. inaktiviertem Serum nicht wesentlich.

Fortsetzung

Tabelle 12: cpm-Werte sind angegeben

Partikel	Serum Ziege		Serum Pferd		Serum Hahn	
	aktiv	inakt.	aktiv	inakt.	aktiv	inakt.
Ps. aeruginosa	915,6	809,9	661,7	706,9	552,1	432,5
E.coli H13	576,6	526,8	517,2	435,9	344,2	334,3
E.coli H11	299,5	335,1	514,6	439,2	349,0	316,7
Sta.epidermidis	381,8	381,8	398,3	360,2	n.t.	n.t.
Str.zooepidemicus	419,8	431,1	129,8	62,4	n.t.	n.t.
E.insidiosa	195,3	194,8	157,2	74,6	n.t.	n.t.
Sta. aureus	239,8	299,0	211,2	200,4	193,2	111,6

cpm = counts per minute

9. Einfluß einer Erhöhung des Serumanteils auf den
Glucose-1-¹⁴C Metabolismus während der Phagozytose
von lebenden Bakterien

Bei diesem Versuch wurde die jeweilige Bakteriensuspension mit 0,3 ml bzw. 0,5 ml bzw. 1,0 ml autologem Serum während eines Zeitraums von 30 Minuten inkubiert.

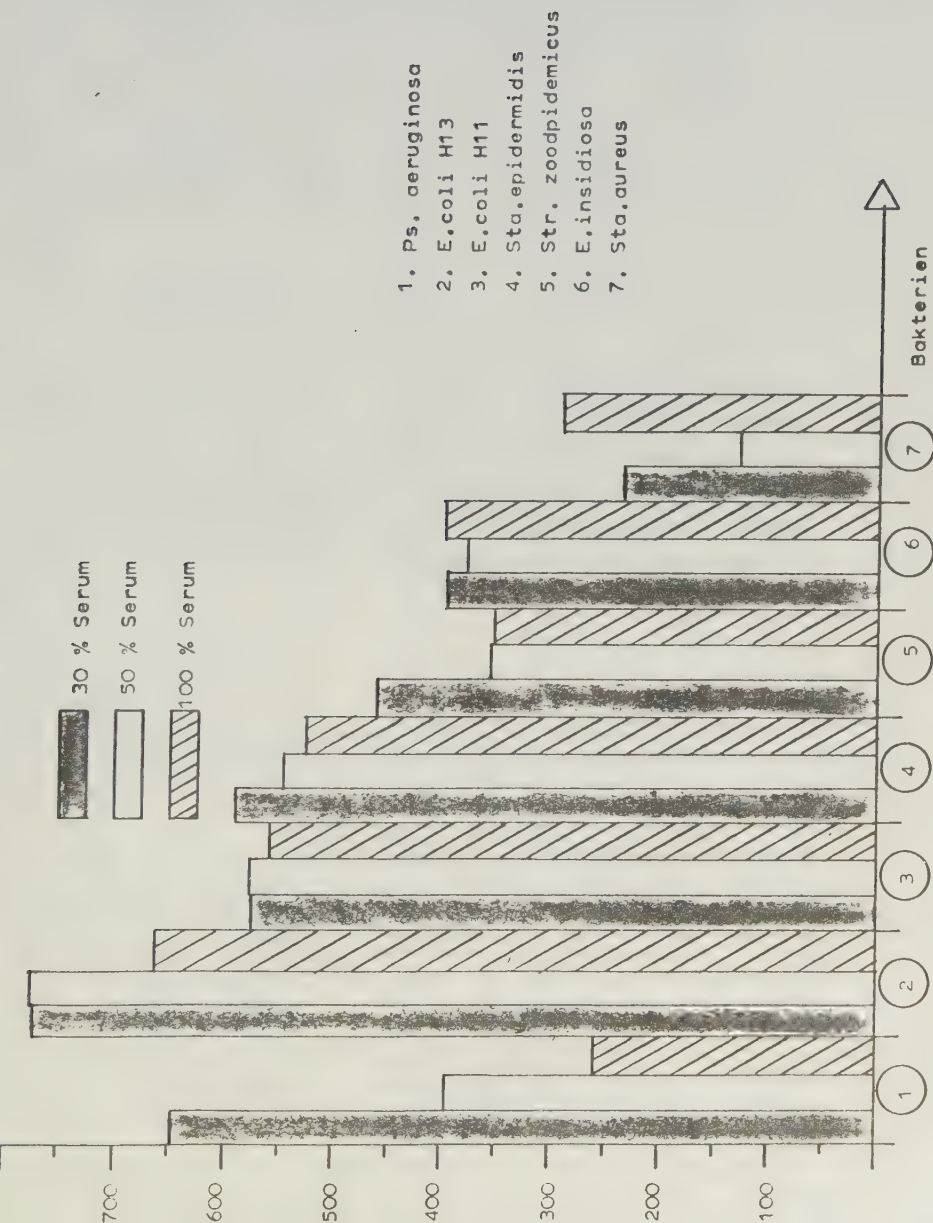
Tabelle 13: Einfluß eines verschieden hohen Serumanteils auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus während der Phagozytose von lebenden Bakterien.
 cpm-Werte sind angegeben

Partikel	autologes Serum (nicht inaktiviert)		
	30 % cpm $\pm$ s	50 % cpm $\pm$ s	100 % cpm $\pm$ s
Ps.aeruginosa	648,6 $\pm$ 90,7	395,8 $\pm$ 80,1	257,3 $\pm$ 48,4
E.coli H13	772,1 $\pm$ 69,5	773,0 $\pm$ 71,1	663,1 $\pm$ 58,3
E.coli H11	577,5 $\pm$ 49,6	578,7 $\pm$ 50,3	557,5 $\pm$ 49,6
Sta.epidermidis	590,4 $\pm$ 47,8	545,8 $\pm$ 42,6	526,2 $\pm$ 39,4
Str.zooepidemicus	461,2 $\pm$ 94,1	354,1 $\pm$ 60,9	352,5 $\pm$ 58,1
E.insidiosa	394,2 $\pm$ 68,9	378,4 $\pm$ 62,4	398,1 $\pm$ 66,4
Sta. aureus	236,2 $\pm$ 22,4	127,5 $\pm$ 8,9	287,2 $\pm$ 25,3

cpm = counts per minute

Wie aus Tabelle 13 zu ersehen ist, scheint die Menge des zugesetzten Serums keinen Einfluß auf die Phagozytose zu haben.

Abb. 7: Einfluß bei einer Erhöhung des zugesetzten Serum-anteils auf die Glucose-1-¹⁴C Oxidationsrate von Schweineleukozyten.



10. Untersuchungen des Phagozytoseverhaltens während der ersten 3 Lebensmonate

Ein weibliches und männliches Ferkel wurden vom 1. Tag der Geburt bis zum Zeitpunkt von 12 Wochen auf ihr Phagozytoseverhalten mittels der Glucose-1-¹⁴C Oxi-dationsrate untersucht. Als Testpartikel dienten Latex, E.coli H11 und Sta. aureus.

Aus Tabelle 14 und 15 ist zu entnehmen, daß ab der 1. Lebenswoche die volle Stoffwechselaktivierung während der Phagozytose vorhanden ist, die allerdings wöchentlichen Schwankungen unterliegt. Zu erkennen ist wiederum, daß der gramnegative Keim E.coli H11 stärker phagozytiert wird, als der grampositive Keim Sta. aureus. Unterschiede bezüglich des Geschlechts sind nicht zu erkennen (beide Tiere zeigten während der Untersuchungszeit gute Entwicklung und keine erkennbaren Krankheiten).

Tabelle 14: Männliches Ferkel; Untersuchung des Glucose-1- ^{14}C Metabolismus.
cpm-Werte sind angegeben, wobei jeder Wert den Mittelwert aus
drei Messungen darstellt.

Partikel	1. Wo	3. Wo	4. Wo	5. Wo	6. Wo	8. Wo	10. Wo	12. Wo
Latex	92,0	95,7	57,0	153,6	139,5	57,0	158,4	140,4
E.coli H11	428,5	534,3	357,2	691,8	492,0	492,0	645,8	411,1
Sta. aureus	246,2	285,2	154,1	237,7	177,4	137,5	244,2	201,5

Tabelle 15: Weibliches Ferkel; Untersuchung des Glucose-1- ^{14}C Metabolismus.
cpm-Werte sind angegeben, wobei jeder Wert den Mittelwert aus
drei Messungen darstellt.

Partikel	1. Wo	3. Wo	4. Wo	5. Wo	6. Wo	8. Wo	10. Wo	12. Wo
Latex	108,8	175,2	n.t.	213,9	189,0	106,0	158,0	193,7
E.coli H11	449,7	486,9	n.t.	577,5	527,8	350,5	670,7	496,9
Sta. aureus	311,6	324,8	n.t.	244,0	200,3	101,1	240,4	236,9

cpm = count per minute

n.t. = nicht untersucht

11. Der Einfluß von Medikamenten auf den Glucose-Metabolismus während der Phagozytose

Zunächst wurde der Einfluß von Klebsiella-Lipopolysaccharid auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus von Schweineleukozyten während der Phagozytose von lebenden Bakterien gemessen (Tab. 15)

Tab. 15: Der Einfluß von Klebsiella-Lipopolysaccharid auf den Glucose-1-¹⁴C Metabolismus. Zusatz von 0,1 ml und 0,2 ml Lipopolysaccharid. P/R-Werte sind angegeben

Partikel	Vollblut	Vollblut + 0,1 ml LPS	Vollblut + 0,2 ml LPS
Latex	3,3	4,9	4,2
Ps.aeruginosa	8,5	10,9	16,2
E.coli H13	10,7	13,5	17,1
E.coli H11	8,6	11,0	16,4
Sta.epidermidis	5,5	5,3	17,1
Str.zooepidemicus	6,8	5,8	10,6
E.insidiosa	6,6	6,2	4,3
Sta. aureus	3,2	3,6	4,2

P/R = Verhältnis der phagozytierenden zu den ruhenden Zellen

Mit Ausnahme von E.insidiosa ist nach Zugabe von Klebsiellen Lipopolysaccharid eine signifikante Stimulierung des Glucose-1-¹⁴C Metabolismus während der Phagozytose zu beobachten.

Nun wurde der Einfluß von Hydrocortisonacetat auf den Glucose-1- ^{14}C Metabolismus von Schweineleukozyten während der Phagozytose gemessen (Tab. 16).

Tabelle 16: Glucose-1- ^{14}C Metabolismus während der Phagozytose nach Zusatz von 0,1 ml Hydrocortisonacetat.

P/R-Werte sind angegeben

Partikel	Vollblut	Vollblut + 0,1 ml H-Cortison
Latex	1,2	1,1
Ps.aeruginosa	14,1	6,2
E.coli H13	18,5	14,9
E.coli H11	14,4	17,7
Sta.epidermidis	5,7	5,9
Str.zooepidemicus	6,1	5,3
E.insidiosa	5,7	3,7
Sta. aureus	4,3	3,7

P/R = Verhältnis der phagozytierenden zu den ruhenden Zellen

Obwohl die Ergebnisse nicht einheitlich sind, kann ein depressiver Effekt von Hydrocortisonacetat auf den Glucose-1- ^{14}C Metabolismus während der Phagozytose festgestellt werden.

Als weiteres Mittel, welches einen Einfluß auf die Phagozytose besitzt, wurde Dextran mit verschiedenen Molekulargewichten untersucht.

Tabelle 17: Einfluß von Dextran (verschiedene Molekulargewichte) auf den Glucose-1- ^{14}C Metabolismus von Schweineleukozyten während der Phagozytose
Zusatz von 0,1 ml Dextran, MG = 20.000
P/R-Werte sind angegeben

Partikel	Vollblut	Vollblut + 0,1 ml Dextran
Latex	2,0	3,4
Ps.aeruginosa	8,8	6,5
E.coli H13	9,3	7,3
E.coli H11	8,2	7,5
Sta.epidermidis	5,3	5,2
Str.zooepidemicus	5,9	5,7
E.insidiosa	5,3	7,0
Sta. aureus	2,7	3,2

Tabelle 18: Zusatz von 0,1 ml Dextran, MG 40.000
P/R-Werte sind angegeben

Partikel	Vollblut	Vollblut + 0,1 ml Dextran
Latex	2,0	2,4
Ps.aeruginosa	7,8	5,3
E.coli H13	6,8	8,5
E.coli H11	5,3	5,8
Sta.epidermidis	4,9	6,4
Str.zooepidemicus	3,4	6,5
E.insidiosa	2,9	3,5
Sta.aureus	1,6	1,9

P/R = Verhältnis der phagozytierenden zu den ruhenden Zellen

Tabelle 19: Zusatz von 0,1 ml Dextran, MG = 1.000.000
P/R-Werte sind angegeben

Partikel	Vollblut	Vollblut + 0,1 ml Dextran
Latex	2,0	2,5
Ps. aeruginosa	7,8	6,9
E.coli H13	6,8	6,8
E.coli H11	5,3	6,4
Sta. epidermidis	4,9	5,4
Str. zooepidemicus	3,4	4,5
E.insidiosa	2,9	3,0
Sta. aureus	1,6	3,2

P/R = Verhältnis der phagozytierenden zu den ruhenden Zellen

Wie aus Tabelle 18 und 19 zu ersehen ist, hat Dextran vom Molekulargewicht 40.000 und 1.000.000 eine stimulierende Wirkung auf die Phagozytose.

12. Der Glucosestoffwechsel nach Filtration des Blutes durch eine Nylonfaser Säule

Schweineblut enthält ungefähr 86 % Erythrozyten und 14 % Leukozyten. Geprüft werden sollte die Frage, welchen Anteil an der Gesamtproduktion von $^{14}\text{CO}_2$ aus Glucose-1- ^{14}C die nicht-phagozytierenden Zellen des Blutes haben. Um diese Frage zu klären, wurde das Vollblut durch eine Nylonfaser Säule (LP-1 Leuko-Pak Leukozyten-Filter, Fenwal Lab. Morton Grove) filtriert und der Glucose Metabolismus während der Phagozytose in dem Filtrat gemessen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, daß der Hauptteil der Zellen in dem Nylonfaser-Filtrat aus Erythrozyten und Lymphozyten bestand.

Tabelle 20: Glucose-1- ^{14}C Metabolismus von Schweineblut während der Phagozytose von *Staphylococcus epidermidis* ($2 \times 10^9/\text{ml}$) vor und nach der Filtration durch eine Nylonfaser Säule
cpm-Werte sind angegeben
Mittelwert aus 5 Versuchen $\pm$ Standard-Abweichung

Vollblut vor der Filtration + Sta. epid.	719,53 $\pm$	41,59
Vollblut vor der Filtration ohne Partikel	73,24 $\pm$	2,20
Vollblut nach der Filtration + Sta. epid.	142,25 $\pm$	16,65
Vollblut nach der Filtration ohne Partikel	54,17 $\pm$	5,69

13. Aufnahme von radioaktiv markierten Bakterien durch Schweineleukozyten

Um die Ergebnisse der Beeinflussung des Glucosestoffwechsels während der Phagozytose mit dem tatsächlichen Phagozytoseverhalten der Zellen in Beziehung zu bringen, wurde ein Phagozytostest durchgeführt, bei dem Bakterien radioaktiv markiert wurden und die Aufnahme in Leukozyten gemessen wurde.

Tabelle 21: Aufnahme radioaktiv markierter Bakterien
in Schweineleukozyten
cpm-Werte sind angegeben

Bakterien	cpm nach Suspendierung der Bakterien in:		
	PBS	homolog. Serum	inaktiviertes homolog.Serum
Ps. aeruginosa	3827,3	4937,0	4248,0
Ps. aeruginosa (inaktiviert)	483,0	1777,0	545,8
E.coli H11	2869,4	4878,1	3156,0
E.coli H11 (inaktiviert)	1241,0	769,4	1402,0

cpm = counts per minute

Auch in diesem Versuch konnte eine Reduktion in der Phagozytoserate beobachtet werden, wenn hitze-inaktivierte Bakterien verwendet wurden.

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Mit Hilfe der Messung der $^{14}\text{CO}_2$ Ausscheidung aus Glucose-1- ^{14}C bzw. Glucose-6- ^{14}C während der Phagozytose wurde versucht, den Einfluß verschiedener Faktoren auf die Stimulation des Glucosestoffwechsels von Schweineleukozyten zu erkennen.

Erstes Ziel der Untersuchungen war die Klärung der Frage, ob der Grad der Stimulgktion direkt von der Art und Anzahl der zugesetzten Partikel abhängt. Frühere Ergebnisse (KEUSCH 1973, SELVARAJ und SBARRA 1966) hatten gezeigt, daß eine vermehrte Glucose-Oxidation für eine normale bakterizide Aktivität der polymorphkernigen Leukozyten notwendig ist und in direkter Relation dazu steht. Die Versuche wurden meist mit abgetöteten Bakterien oder inerten Partikeln durchgeführt. In dieser Arbeit wurde versucht, einen Vergleich zwischen lebenden und abgetöteten Bakterien bezüglich ihrer den Stoffwechsel stimulierenden Wirkung während der Phagozytose zu erstellen. Da wegen der Eigenaktivität der Mikroorganismen mit Schwierigkeiten in der Interpretation der Versuche zu rechnen war, wurde der Anteil, den lebende Bakterien an der $^{14}\text{CO}_2$ Produktion aus Glucose-1- ^{14}C bzw. Glucose-6- ^{14}C haben, errechnet und in Abzug gebracht. Der Vergleich zeigte, daß lebende Bakterien die Phagozytoseaktivität stärker stimulieren als abgetötete Bakterien. Allerdings ist diese Eigenschaft bei den verschiedenen getesteten Bakterien unterschiedlich stark ausgeprägt. Weiter war zu erkennen, daß die Art des Partikels einen wesentlich subtileren Einfluß hat, als bisher vermutet wurde. Gramnegative Bakterien bewirken eine stärkere Stimulation als grampositive Bakterien. Dasselbe Ergebnis konnte sowohl bei der Messung mit lebenden, als auch mit abgetöteten Bakterien erzielt werden. Mit Hilfe einer neuen radiospirometrischen Technik (Ionisationskammer Methode) konnten DAVIDSOHN und TANAKA (1973) zeigen, daß die Produktion von $^{14}\text{CO}_2$ aus Glucose-6- ^{14}C unbedeutend ist, was anzeigt, daß der Glucose-

Metabolismus in den Granulozyten fast vollständig über den Pentose-Phosphat-Zyklus geht. Das Ergebnis konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, und zeigt zugleich, daß einzelne Bakterien auf Grund ihrer intrazellulären Enzyme über einen Glucose-6- ^{14}C Metabolismus verfügen (Parallel zu allen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit Glucose-1- ^{14}C wurde auch Glucose-6- ^{14}C getestet. Es konnte keine $^{14}\text{CO}_2$ Ausscheidung aus Glucose-6- ^{14}C während der Phagozytose von verschiedenen Bakterien festgestellt werden).

1973 beschrieben DAVIDSOHN und TANAKA den Einfluß verschiedener Mengen von inerten Latex Partikeln auf die Glucose-Oxidationsrate; eine Erhöhung der Latex Menge bewirkte einen auffällig gesteigerten Glucose-1- ^{14}C Metabolismus. SBARRA und KARNOVSKI (1959) berichten von einer gesteigerten Atmung der polymorphkernigen Leukozyten bei erhöhter Partikelzahl. Ein in dieser Arbeit durchgeführter Versuch bei verschiedenen Bakterienkonzentrationen läßt erkennen, daß erst ab einer bestimmten Partikelkonzentration eine massiv gesteigerte Stimulation des Glucose-Stoffwechsels während der Phagozytose eintritt. Der Effekt ist bei lebenden und abgetöteten Bakterien ähnlich.

In früheren Untersuchungen fand KEUSCH (1972), daß die Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ in Anwesenheit von Partikeln maximal 30 Minuten anhielt. Die jetzt gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß die kumulative $^{14}\text{CO}_2$ Produktion über einen Zeitraum von mindestens 60 Minuten anhält, und das Maximum zwischen 30 und 60 Minuten erreicht wird, je nach Art des Partikels. Dies zeigt, daß die Interpretation der Phagozytosestimulation durch verschiedene Bakterienarten auf Grund der vielen Faktoren, die hier Einfluß haben, leicht verfälscht werden kann.

Bei Zusatz von autologem, homologem und heterologem Serum zu gewaschenem Blut, zeigte sich, daß eine ähnlich hohe Stimulierung des Glucose-Stoffwechsels während der Phagozytose

wie bei Verwendung von Vollblut zu erzielen war. Die Art des verwendeten Serums, eine eventuelle Hitzeinaktivierung und eine Erhöhung der Serummenge hatten dagegen keinen Einfluß.

Ontogenetische Untersuchungen zeigen, daß die Stimulierung des Glucose-Stoffwechsels während der Phagozytose ab der Geburt voll entwickelt ist. 1973 beschrieb ALTSTÄDTEN die Abhängigkeit der Phagozytoserate vom jeweiligen Testtag. Wegen der geringen Blutmenge, die jeweils von den Ferkeln gewonnen werden konnte, war nur eine Testung mit wenigen Partikeln möglich. Das Ergebnis des stärkeren stimulierenden Effekts durch ein gramnegatives Bakterium läßt sich aber auch hier bestätigen. 1973 prüfte LECHNER mit einem in vitro Versuch bei rund 200 weiblichen und 200 männlichen Schweinen die Phagozytoseaktivität hinsichtlich des Geschlechts; er konnte keine signifikante Abweichung feststellen. Bei den jetzt überprüften weiblichen und männlichen Ferkeln ist ebenfalls kein Unterschied bezüglich des Phagozytoseverhaltens zu erkennen. Eine Messung der Glucose-1-¹⁴C Oxidation von Blut vor und nach Filtrierung mittels einer Nylonfaser Säule zeigt, daß die Leukozyten den Hauptanteil an der ¹⁴CO₂ Produktion haben. Die Testung einiger Drogen brachte folgende Ergebnisse: Ein Klebsiellen Lipopolysaccharid zeigte eine stimulierende Wirkung, wobei die Menge des zugesetzten Lipopolysaccharids einen Einfluß hat. Der in der Literatur beschriebene depressive Effekt von Cortison auf die funktionelle Aktivität der Phagozyten (HELLER 1955) ließ sich auch bei diesem in vitro Test bestätigen. Dextran mit dem Molekulargewicht 40.000 und 1 Mio. bewirkte eine Stimulation der Phagozytose.

Ein Phagozytostest mit Hilfe von radioaktiv markierten Bakterien ließ eine verminderte Phagozytoserate bei Zusatz von hitzeinaktivierten Bakterien erkennen. Die Rangfolge des stimulierenden Effekts durch verschiedene Bakterien war bei diesem Phagozytostest nicht in Einklang

mit der Rangfolge des Glucose-Stoffwechseltests zu bringen.

Die gewonnenen Ergebnisse sprechen dafür, daß die metabolische Antwort der Leukozyten auf die Phagozytose zumindest zum Teil eine Funktion des verdauten Partikels ist, und daß die Veränderung im Glucose-1-¹⁴C Stoffwechsel während der Phagozytose den Grad der Phagozytoseaktivität in den Granulozyten widerspiegeln.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurde die Stimulation des Glucose-1- ^{14}C und des Glucose-6- ^{14}C Metabolismus in Schweineleukozyten während der Phagozytose von Bakterien und inerten Partikeln. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Das Ausmaß der Glucose-Oxidation (G-1- ^{14}C) während der Phagozytose steht in direkter Relation zur Art der zugefügten Partikel. Gramnegative Bakterien stimulieren intensiver als grampositive Bakterien.
2. Lebende Bakterien stimulieren den Glucose-1- ^{14}C Metabolismus stärker als die gleiche Anzahl hitzeinaktivierter Bakterien.
3. Der Stoffwechselweg der Glucose-6- ^{14}C Oxidation ist bei der Phagozytose von Bakterien unbedeutend.
4. Einen signifikanten Einfluß auf den Glucose-1- ^{14}C Metabolismus hat die Konzentration der zugefügten Bakterien.
5. Die $^{14}\text{CO}_2$ Produktion während der Phagozytose von Bakterien hält über einen Zeitraum von mindestens 60 Minuten an.
6. Bei Zusatz von Serum zu gewaschenem Blutsediment hat die Art des Serums, eine eventuelle Hitzeinaktivierung, und eine Erhöhung der zugesetzten Serummenge keinen Einfluß.
7. Ferkel zeigen von Geburt ab eine voll entwickelte Stimulation des Glucose-Stoffwechsels während der Phagozytose.
8. Klebsiellen-Lipopolysaccharid und Dextran vom MG 40.000 und 1 Mio. haben einen stimulierenden Effekt auf die Phagozytose, Hydrocortison hat einen depressiven Effekt.

9. Der Phagozytostest mit Hilfe von radioaktiv markierten Bakterien bestätigt das Ergebnis einer verminderten Phagozytoserate bei Zusatz von hitzegetöteten Bakterien.

SUMMARY

The stimulation of the D-(1-¹⁴C) glucose and D-(6-¹⁴C) glucose metabolism in pig leucocytes during the phagocytosis of bacteria and inert particles was studied. The following results were obtained:

1. The magnitude of phagocytosis-stimulated glucose oxidation is directly related to the nature and number of particles added.
2. Live bacteria stimulate the glucose metabolism to a greater extent than do a similar number of heat-killed organisms. As to the extent of the stimulation the species of bacteria offered for phagocytosis is crucial.
3. The stimulation of the D-(6-¹⁴C) glucose metabolism in pig leucocytes during phagocytosis of bacteria and inert particles is negligible.
4. The extent of the stimulation of the D-(1-¹⁴C) glucose metabolism is also related to the incubation time.
5. Though the stimulating effect of serum is apparent, the origin and quantity of serum causes no variation.
6. After in vitro addition of a lipopolysaccharide and dextran a stimulating effect is observed, a depression has been shown after the addition of hydrocortisone.
7. From birth on piglets show a stimulation of the D-1-¹⁴C metabolism during phagocytosis.

IV. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abramson, J.: The mechanism of the inflammatory process
J. Exp. Med. 46, 987 (1927)

2. Altstädten, W.: Messung der Phagozytoseaktivität im Blut von Haustieren mittels der ¹⁴C-Glucose Oxidationsrate
Vet. Med. Diss. München (1973)

3. Baehner, R.L., N. Gilman und M.L. Karnovsky:
Respiration and glucose oxidation in human and guinea pig leucocytes; comparative studies
J. Clin. Invest. 49, 692 (1970)

4. Beck, W.S.: The control of leukocyte glykolysis
J. Biol. Chem. 232, 251 (1958)

5. Becker, H., G. Munder und H. Fischer:
Über den Leukozytenstoffwechsel bei der Phagozytose
Z. Physiol. Chem. 313, 266 (1958)

6. Benacerraf, B., C. Stiffel, G. Biozzi und B.N. Halpern:
C.R. Soc. Biol. Paris 148, 486 (1954)

7. Benacerraf, B., C. Stiffel, B.N. Halpern, G. Couhaud und G. Biozzi:
Ann. Inst. Pasteur 89, 601 (1955)

8. Biozzi, G., G. Mené und B.N. Halpern:
Brit. J. Exp. Path. 34, 441 (1953)

9. Buschmann, H. und W. Altstädten:
Messung der Phagozytoseaktivität im Blut von Haustieren
Zbl. Vet. Med. 20, 321 (1973)

10. Cohn, Z.A. und S. J. Morse:
Functional and metabolic properties
of polymorphnuclear leukocytes
I. observation on the requirements
and consequences of particle ingestion
J. Exp. Med. 111, 667 (1960)

11. Cohn, Z.A. und J. G. Hirsch:
The influence of phagocytosis on the
intracellular distribution of granule-
associated components of polymorphonu-
clear leukocyte
J. Exp. Med. 112, 1015 (1960)

12. Cohn Z.A. und J.G. Hirsch:
The isolation and properties of
the specific cytoplasmic granuls of
rabbit polymorphonuclear leukocytes
J. Exp. Med. 112, 983 (1960)

13. Craddock, G.J.Jr.: The physiology of granulocytic cells
in normal and leukemic states
Ann. J. Med. 28, 711 (1960)

14. Davidsohn W.D. und K.R. Tanaka:
Instantenous and continous measure-
ment of phagocytosis-stimulated
glucose oxidation in human granulo-
cytes by an ionization chamber
method
Brit. J. Haematol. 25, 783 (1973)

15. De Chatelet, L.R., D. Mullikin, P.S. Shirley und
C.E. McCall:
Phagocytosis of live versus heat-
killed bacteria by human polymorpho-
nuclear leukocytes
Infection and Immunity 10, 25 (1974)

16. De Chatelet, L.R., Charles E. McCall und M. Robert Cooper:
Amino Acid Oxidase in leukocytes; evi-
dence against a major role in phagocytosis
Infection and Immunity 7, 632 (1971)

17. De Duve, C.: The lysosome in retrospect
Editors Dingel J.T. und H.B. Fell
North-Holland Publ. Comp. Amsterdam-
London S 13 (1967)

18. Evans, W.H. und M.L. Karnovsky:
A possible mechanism for the stimu-
lation of some metabolic functions
during phagocytosis
J. Biol. Chem. 236, PC 30 (1961)

19. Fisher, T.N., H.S. Ginsberg:
The reaction of influenza viruses
with guinea pig polymorphonuclear
Leukocytes
Virology 2, 656 (1956)

20. Fishman, M. und M.S. Silverman:
Bactericidal activity of rat
leukocytic extracts; I. Antibacteri-
cal spectrum and the subcellular
localisation of the bactericidal
activity
J. Exp. Med. 103, 521 (1957)

21. Gordon, A.S., G.F. Katsh:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 52, 1 (1949)

22. Graft H. und B. Jochims:
Physikalisch-chemische Untersuchen-
gen über Leukozytenwanderung
Arch. ges. Physiol. 216, 611 (1927)

23. Hirsch, J.G.: Biochemical studies on the bacteri-
cidal power of phagocytic cells
Ann. N.Y. Acad. 66, 382 (1956)

24. Hirsch, J.G.: Phagocytin; a bactericidal substance
from polymorphonuclear leukocytes
J. Exp. Med. 103, 589 (1956)

25. Hirsch, J.G.: Studies on the bactericidal
 action of phagocytin
 J. Exp. Med. 103, 613 (1956)

26. Heller, J. H.: Effect of cortisone on the func-
 tion, capacity and activity of
 the reticuloendothelial system
 Fed. Proc. 12, 65 (1953)

27. Hollmann, S., O. Touster:
 Non-glycolytic pathways of meta-
 bolism of glucose
 Academic Press New York, Vol.2 (1964)

28. Holmes, B., A.R. Page und R. A. Good:
 Studies on the metabolic activity
 of leukocytes from patients with
 genetic abnormality of phagocytic
 function
 J. Clin. Invest. 46, 1422 (1967)

29. Iyer, G.Y.N., D.M.F. Islam und J.H. Quastel:
 Biochemical aspects of phagocytosis
 Nature 192, 535 (1961)

30. Jawetz, E.: Medizinische Mikrobiologie
 Springer Verlag Berlin (1973)

31. Juhlin, L.: Acta dermat. venereol. 36, 131
 (1956)

32. Klebanoff, J.S. Jodination of bacteria:
 a bactericidal mechanism
 J. Exp. Med. 126, 1063 (1967)

33. Lerner Edwin, M.D.: Phagocytosis of bacteria in the absence of antibody and the effect of physical surface
J. Exp. Med. 104, 233 (1956)

34. Maltaner und Hoppe: The chemotactic effect of osmosis upon leucocytes
J. Hyg. 19, 309 (1920)

35. Oss Carel, J.: Influence of glucose levels on the in vitro phagocytosis of bacteria by human neutrophils
Infection and Immunity 4, 54 (1971)

36. Parappally N.P. und D.G. Ingram: Role of immunoconglutinin in resistance to infection
Immunology, 25, 523 (1973)

37. Ponder: A contribution to the theory of phagocytosis
J. Gen. Physiol. 9, (1926)

38. Qualliotine, Diane, L.R. de Chatelet, E. McCall und M.R. Cooper: Effekt of catecholamines on the bacteriocidal activity of polymorphonuclear leukocytes
Infection and Immunity 3, 211 (1972)

39. Rapoport, S.M.: Stoffwechsel in der Phagzytose
Medizinische Biochemie, S. 610
VEB-Verlag, Berlin (1964)

40. Reynolds, H.Y. und R.E. Thompson: Pulmonary host defences; interaction of respiratory antibodies with pseudomonas deruginosa and alveolar macrophages
J. of Immunity 2, 369 (1973)

41. Sawtschenko: Studies of phagocytosis
Arch. Sci. Biol. 145 (1910)
42. Sbarra, A.J. und M.L. Karnovsky:
The biochemical basis of phagocytosis. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leucocytes
J. Bio. Chem. 234, 1355 (1959)
43. Sbarra, A.J. und M.L. Karnovsky:
The biochemical basis of phagocytosis. II. Incorporation of ^{14}C labelled building blocks into lipid, protein and glycogen during phagocytosis
J. Biol. Chem. 235, 2224 (1960)
44. Selvaraj, R.J. und A.J. Sbarra:
Relationship of glycolytic and oxidative metabolism to particle entry and destruction in phagocytizing cells
Nature 211, 1272 (1966)
45. Selvaraj, R.J., R.J. McPipley und A.J. Sbarra:
The metabolic activities of leucocytes from lymphoproliferative and myeloproliferative disorders during phagocytosis
Cancer. Res. 27, 2287 (1967)
46. Stolberg, C.O., Kjell B. Hellum:
Influence of serum on the bactericidal activity of neutrophil granulocytes
Acta path. microbiol. scand. 81, 621 (1973)

46. Stähelin, Hartmann, M.L. Karnovsky, A.E. Farnham
und E. Suter Studies on the interaction between
phagocytes and tubercle bacilli
III. Some metabolic effects in guinea
pigs associated with infection with
tubercle bacilli
J. Exp. Med. 104, 265 (1956)
48. Stähelin, Hartmann, M.L. Karnovsky und E. Suter:
Studies on the interaction between
phagocytes and tubercle bacilli
II. The action of phagocyte upon
¹⁴C-labelled tubercle bacilli
J. Exp. Med. 104, 137 (1956)
49. Stähelin, Hartmann, M.L. Karnovsky und E. Suter:
Studies on the interaction between
phagocytosis and tubercle bacilli.
I. Observation on the metabolism of
guinea pig leukocytes and the in-
fluence of phagocytosis
J. Exp. Med. 104, 121 (1956)
50. Starka, Jiri: Physiologie und Biochemie der
Mikroorganismen
Fischer-Verlag Stuttgart (1968)
51. Stossel, Th. P.: Phagozytose
Immunbiologische Informationen
E.V. Bering 3, (1975)
52. Strauss, B.W.: Biochemical activity of the
leukocyt
Physiol. Rev. 42, 143 (1962)
53. Thompson, J., R. v. Furth:
The effect of glucocorticosteroids
on the kinetics of mononuclear
phagocytes
J. Exp. Med. 3, 429 (1970)

54. Wells, H.G.: Phagozytäre Immunität
Fischer-Verlag, Jena (1932)
55. White, R.G.: Clinical Aspects of Immunology
Oxford (1963)
56. Wright, A.E., S.R. Douglas:
An experimental investigation of
the role of the blood fluids in
connection with phagocytosis
Proc. Royal Soc. London 72, 357
(1903)

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr möchte ich für die vorzüglichen Arbeitsmöglichkeiten an seinem Institut danken.

Herrn Prof. Dr. H. Buschmann bin ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung und die Anteilnahme am Gelingen der Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

LEBENS LAUF

Barbara Hench, geb. Frohnwieser

Geboren am 09.06.47 in Oberschneiding/Straubing

Eltern: Dr. med. Karl Frohnwieser, Auguste Frohnwieser, geb.
Kaiser

Ausbildung:

- Volksschule: 1953 - 57 in Velden/Vils
- Oberschule: 1957 - 67 Mädchenrealgymnasium Seligenthal
in Landshut und Kurt-Hubergymnasium
in Grädfeling
Abitur 1967
- Studium der Tiermedizin in München
Studienbeginn Wintersemester 67/68
1968 Vorphysikum
1970 Physikum
1973 Staatsexamen
- Studium der Humanmedizin in München
Studienbeginn Wintersemester 72/73
1974 Physikum

Heirat: 29.10.1976

Im Oktober 1974 begann ich mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation, die ich im Oktober 1976 abschloß.

